



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Pós Graduação em Biologia Microbiana

## **Interação *Trypanosoma cruzi* e hospedeiro: influência do parasita na expressão da subunidade $\beta$ 1i do imunoproteassoma**

**Juliana Vieira Ferreira Name**

**Orientadora: Profa. Beatriz Dolabela de Lima**

**Brasília**

**2017**



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Celular  
Pós Graduação em Biologia Microbiana

**Interação *Trypanosoma cruzi* e hospedeiro: influência do parasita na expressão da subunidade  $\beta$ 1i do imunoproteassoma**

**Juliana Vieira Ferreira Name**

**Orientadora: Profa. Beatriz Dolabela de Lima**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Microbiana  
da Universidade de Brasília**

**Brasília**

**2017**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia do Gene da Universidade de Brasília, sob a orientação da Professora Dra. Beatriz Dolabela de Lima.

À minha mãe Rosangela, por sempre me dar o suporte e apoio para que eu pudesse ir atrás dos meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de utilizar esse espaço para agradecer à todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta caminhada nos últimos dois anos. Houveram momentos complicados, mas houveram mais momentos bons e alegres e todos vocês contribuíram para isso. Tenho certeza que vou esquecer de gente aqui, vocês são muitos e minha memória não é das melhores.

Agradeço à CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana pelo apoio financeiro e confiança no nosso trabalho e por me permitir fazer o que eu gosto.

À Professora Beatriz Dolabela de Lima, por ter aberto as portas para uma total desconhecida. Muito obrigada pelo voto de confiança e por ter me ensinado tantas coisas nesses últimos dois anos.

À Professora Izabela Marques Dourado Bastos Charneau, por permitir o uso de equipamentos sem os quais esse trabalho não poderia ser realizado da forma que foi, muito obrigada pela confiança.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia do Gene, Agnelo (Guigos), Agenor, Fabiana, Luana, Bianca, Gabriel, Mariana, Sarah, Professora Cecília, pelo conhecimento compartilhado e pelos momentos de descontração.

Ao pessoal do Laboratório de Interação Parasita-Hospedeiro por me ajudarem de diversas formas ao longo do mestrado. Carroll, Allan, Amanda, Clênia, Camila, Milene, Kaio, Grazi, Bia, Natália e todos os outros, todos vocês tornaram esses dois anos mais animados.

Agradeço também àqueles que mesmo não trabalhando nos laboratórios foram muito importantes nesse processo e à alguns que são importantes na minha vida dentro e fora dos laboratórios.

À minha mãe Rosângela, pelo apoio para que eu corresse atrás dos meus objetivos, pela paciência e ajuda com o Jake (que foi lindo e também paciente quando eu passava horas escrevendo em casa e ele simplesmente se deitava no meu colo) quando meus horários ficavam de ponta cabeça e eu chegava tarde em casa e por acreditar em mim. Tenha certeza que sem sua ajuda esses dois anos teriam muito mais momentos complicados do que tiveram.

Ao meu pai Eduardo por sempre acreditar na minha capacidade de conquistar minhas coisas. Saber que você me ajudava me deu uma tranquilidade maior para me dedicar à minha pesquisa, então muito obrigada.

À minha avó Rita, por tudo que sempre fez por mim.

À tia Neide, por sempre ter ajudado minha mãe a cuidar de mim desde que eu era neném. Por sempre deixar minhas marmitinhas prontas para eu almoçar no dia seguinte no laboratório.

Ao meu irmão Hérick por sempre ter acreditado em mim e me apoiado, mesmo antes de esse processo começar. Tenha certeza que você é muito importante pra mim e você sempre foi uma das pessoas que eu sabia que podia contar sempre.

Às minhas irmãs Laura e Beatriz por terem reaparecido na minha vida. Mini Ju, me divirto com você e estou muito feliz por poder compartilhar esse momento com vocês.

Aos meus tios Celso e Orlando pelas conversas e conselhos e minhas tias Maria Alice e Vera também pelas conversas e pelos abraços.

Aos amigos Caroll, Allan, Rafael, Fernanda, Paula, Laís, Raquel, Agnelo, Lara, Tay, Letícia, meu muito obrigada por entrarem na minha vida, pelos momentos de descontração, pelos conselhos. Sem o apoio e os momentos que tivemos, essa caminhada seria bem mais pesada, e vocês sabem que não me refiro apenas ao mestrado.

Por último gostaria de deixar meu muito obrigado, hoje e sempre, ao Astral, àqueles que me guardam, por sempre me ajudarem a segurar a onda quando eu achava que não dava mais, por sempre me fazerem confiar em mim e correr atrás do que eu quero e por terem colocado cada um de vocês no meu caminho...

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE ABREVIATURAS	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
INTRODUÇÃO	5
1. Panorama histórico da doença de Chagas	5
2. O parasita e o vetor	6
3. Ciclo do parasita no homem	8
4. Proteassoma, imunoproteassoma e a infecção por <i>T. cruzi</i>	10
5. Regulação pós- transcricional - Regiões não traduzidas do RNA (3' e 5' UTR)	12
6. Justificativa	15
OBJETIVOS	19
DESENHO EXPERIMENTAL	20
MATERIAL E MÉTODOS	21
1. Material	21
2. Métodos	25
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO	45
PERSPECTIVAS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .	8
Figura 2. Estrutura do proteossoma e imunoproteassoma.	12
Figura 3. Quantificação do mRNA de subunidades componentes do proteossoma/imunoproteassoma.	17
Figura 4. Quantificação do RNAm de subunidades componentes do proteossoma/imunoproteassoma.	17
Figura 5. Western blot para avaliar a expressão das subunidades induzidas do imunoproteassoma	18
Figura 6. Mapa físico do vetor pGEM®-T Easy (Promega).	24
Figura 7. Mapa físico do vetor pEGFP-N3 (Clontech).	24
Figura 8. Esquema de montagens do <i>EGFP</i> .	31
Figura 9. Estratégia para a amplificação das regiões 5' e 3' UTR do mRNA do gene <i>β1i</i> humano.	32
Figura 10. Estratégia para a amplificação do gene <i>EGFP</i> .	32
Figura 11. Eletroforese da amplificação das sequências de estudo.	33
Figura 12. Análise da eletroforese feita com os produtos da amplificação para confirmação da presença das sequências de interesse na minipreparação do DNA plasmidial.	34
Figura 13. Eletroforese da digestão dos plasmídeos recombinantes com a enzima <i>EcoRI</i> (Promega).	35
Figura 14. Eletroforese das digestões para confirmação dos sítios de restrição inseridos na amplificação do DNA.	36
Figura 15. Ilustração das montagens com os fragmentos no vetor pEGFP-N3 (Clontech).	37
Figura 16. Eletroforese da PCR para confirmar a inserção das montagens inseridas no vetor pEGFP-N3.	38
Figura 17. Resultado do PCR para confirmar a inserção das montagens.	38
Figura 18. Análise da digestão dos vetores pEGFP-N3 contendo as montagens <i>EGFP</i> .	38
Figura 19. Expressão de EGFP em HeLa 48 horas após a transfecção transiente das montagens do gene EGFP.	40



Figura 20. Expressão de EGFP em HeLa de transfecção estável com a montagem 5' e 3' UTR.	41
Figura 21. Expressão de EGFP em HeLa de transfecção estável do gene <i>EGFP</i> . 41	
Figura 22. Análise da citometria de fluxo.	42
Figura 23. Avaliação da emissão de fluorescência.	43
Figura 24. Microscopia de fluorescência do teste de transfecção/infecção.	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco's ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> (Proteína Fluorescente Verde Aprimorada)
IFN- $\gamma$	Interferon gama (gamma Interferon)
PBS	Tampão fosfato-salino ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PCR	Reação em cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
SDS	Dodecilsulfato de sódio ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
TBE	Tris Borato EDTA
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano (Tris (hydroxymethyl) aminomethane)
UTR	<i>Untranslated Regions</i> (Regiões não traduzidas)

## RESUMO

A Doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença causada pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e é considerada endêmica em 21 países da América Latina. Estudos mostraram que a infecção por *T. cruzi* interfere na expressão em nível pós-transcricional de proteínas da via de apresentação MHC classe I, especificamente as subunidades induzíveis do imunoproteassoma ( $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$ ), a subunidade PA28 $\alpha$ , a proteína TAP e o MHC I. O presente estudo teve como objetivo avaliar se as regiões 5' e 3' UTR dos mRNAs dessas proteínas estão envolvidas na inibição da expressão no nível traducional pelo parasita, utilizando como modelo a subunidade  $\beta 1i$  do imunoproteassoma. Para isso, essas duas regiões foram amplificadas e clonadas flanqueando o gene repórter *EGFP* em um vetor de expressão para células eucarióticas. Células transfectadas foram infectadas com *T. cruzi* e após quatro dias foram realizadas citometria de fluxo e microscopia de fluorescência para analisar a expressão da EGFP. Foi possível observar que as células HeLa transfectadas com a montagem do gene *EGFP* contendo as regiões 5'UTR e 3'UTR da subunidade  $\beta 1i$  e infectadas com o parasita apresentaram queda na expressão da EGFP em sua população. Em uma visão mais individualizada por microscopia foi observado que células que apresentavam uma parasitemia elevada não emitiam fluorescência, ou apresentavam menor intensidade que as células na mesma população não infectadas. Nas células transfectadas com o gene *EGFP* sem as regiões UTRs observamos que a presença dos parasitas no interior das células não interferiu na expressão da EGFP. Esses resultados indicam que há uma interferência na expressão da subunidade  $\beta 1i$  do imunoproteassoma durante a infecção por *T. cruzi* e que as regiões UTR são alvos nesse processo de inibição pós-transcricional.

## ABSTRACT

Chagas disease or American trypanosomiasis is a disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) and is considered endemic in 21 countries in Latin America. Studies have shown that *T. cruzi* infection interferes in post-transcriptional level expression of MHC class I pathway proteins, specifically the inducible subunits of the immunoproteasome ( $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  and  $\beta 5i$ ), the PA28 $\alpha$  subunit, the TAP protein and the MHC I. The present study aimed to evaluate whether the 5' and 3' UTR regions of the mRNAs of these proteins are involved in the inhibition of expression at the translational level by the parasite, using as template the  $\beta 1i$  subunit of the immunoproteasome. To that end, these two regions were amplified and cloned flanking the *EGFP* reporter gene into an expression vector for eukaryotic cells. Transfected cells were infected with *T. cruzi* and after four days flow cytometry and fluorescence microscopy were performed to analyze EGFP expression. It was possible to observe that HeLa cells transfected with *EGFP* gene assembly containing the 5'UTR and 3'UTR regions of the  $\beta 1i$  subunit and infected with the parasite showed a decrease in *EGFP* expression in their population. In a more individualized view by microscopy it was observed that cells that had a high parasitemia did not emit fluorescence or were emitted much less intensely than cells in the same uninfected population. In cells transfected with the *EGFP* gene without the UTRs regions we observed that the presence of the parasites inside the cells did not interfere in the EGFP expression. These results indicate that there is interference in the expression of the  $\beta 1i$  subunit of the immunoproteasome during *T. cruzi* infection and that the UTR regions are targets in this post-transcriptional inhibition process.

# INTRODUÇÃO

## 1. Panorama histórico da doença de Chagas

Em 1908 durante a construção de uma ferrovia na região norte do Estado de Minas Gerais, o sanitarista e bacteriologista brasileiro Carlos Chagas (1879-1934) foi informado por um engenheiro sobre a existência de um inseto grande hematófago que picava as pessoas durante o sono preferencialmente no rosto. Para avaliar se havia a presença de um patógeno em potencial para humanos, Chagas fez a dissecação desses insetos e encontrou inúmeros tripanossomas em seus intestinos. Esses parasitas receberam o nome de *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao mentor de Chagas, o bacteriologista Oswaldo Cruz (1872-1917). No Rio de Janeiro, Chagas fez testes em macacos permitindo que os insetos infectados picassem os animais e após um período de 20 a 30 dias foi possível observar os tripanossomas no sangue dos mesmos. Com esses resultados Chagas acreditava ter descoberto um organismo patogênico para seres humanos (STEVERDING, 2014).

A confirmação da hipótese de Chagas ocorreu em 1909 quando ele foi chamado para examinar uma criança de dois anos que apresentava febre, aumento de fígado e baço e inchaço dos linfonodos. O primeiro exame do sangue não indicou a presença do parasita, porém, quatro dias depois, vários tripanossomas com morfologia similar as encontradas nos macacos foram encontrados no sangue da criança. O sanitarista também fez a descrição clínica da fase aguda da doença, relacionou a infecção com a sintomatologia crônica da doença e descreveu o ciclo de vida do parasita (CHAGAS, 1909).

A Doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma doença provocada por um protozoário parasita, o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). A Organização Mundial da Saúde (OMS) (2017) estima que entre seis e sete milhões de pessoas no mundo estão infectadas com o parasita e a maioria dos casos se concentra em 21 países da América Latina, onde a doença é considerada endêmica.

A doença costuma ser demograficamente associada às regiões rurais pobres na América Latina, locais onde os insetos (espécies de Triatomíneos) que atuam como vetores do parasita são encontrados com facilidade. Entretanto a migração das regiões rurais para regiões urbanizadas nas décadas de 70 e 80 resultou na mudança no perfil epidemiológico da doença que é encontrada atualmente em todo o continente americano, Europa, Austrália e Japão, os principais destinos dos imigrantes da América Latina (NUNES et al., 2013).

A taxa de mortalidade dos indivíduos infectados e a debilitação dos indivíduos doentes, em sua maioria jovens adultos, resultam em perdas econômicas significativas. Além disso, indivíduos que evoluem para a fase crônica da doença (30 a 40% dos indivíduos infectados) frequentemente desenvolvem complicações, sendo necessário tratamento por longos períodos e procedimentos cirúrgicos, gerando mais gastos para o Estado (RASSI et al., 2010; ABUHAB et al., 2013).

Existem registros que mostram que o *T. cruzi* é um parasita de seres humanos há pelo menos 9.000 anos (STEVERDING, 2014). O sucesso do parasita em infectar e manter um quadro de infecção de longos períodos é resultado da capacidade do parasita em evadir o sistema imune do hospedeiro. As principais ferramentas conhecidas de evasão do parasita são: o uso de enzimas antioxidantes que protegem o parasita das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio presente do vacúolo parasitóforo que engloba o parasita dentro da célula infectada; a presença de moléculas na membrana do parasita na forma tripomastigota que interferem em componentes chave da ativação do sistema complemento e receptores imunoregulatórios, retardando uma resposta eficaz do sistema imune do hospedeiro; estímulo da ativação de linfócitos B policlonais, hipergamaglobulinemia e produção de anticorpos inespecíficos contra o *T. cruzi*, que são ineficientes contra o controle do parasita (CARDOSO et al., 2016).

Além de apresentar a capacidade de se adaptar ao hospedeiro, a dificuldade em se combater o parasita também reside no fato de ele apresentar diversas formas de transmissão, além do repasto sanguíneo, e de por apresentar diversos epítopos em sua superfície, sendo assim a criação de uma vacina como medida profilática é dificultada (RASSI et al., 2010; CARDOSO et al., 2016).

## **2. O parasita e o vetor**

O *T. cruzi* é um protozoário do filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma*. Este parasita é caracterizado pela presença de flagelo e pela presença de uma mitocôndria contendo o cinetoplasto, uma rede de DNA circular (kDNA) localizada próxima à base do flagelo (RASSI et al., 2012). Uma característica específica desta família é a mudança na morfologia do parasita durante seu ciclo de vida (SOUZA et al., 2010).

A forma amastigota é a forma replicativa do parasita, presente no interior das células de mamíferos hospedeiros, possui forma arredondada, núcleo grande com cinetoplasto próximo ao núcleo; a forma epimastigota é a forma replicativa do parasita encontrada no



A forma mais comum de transmissão da doença é por meio do repasto sanguíneo, quando o parasita presente na excreção do inseto entra em contato com a mucosa do hospedeiro ou por lesões geradas pela picada na pele. Além disso, a transmissão do parasita pode ocorrer de diversas formas como transfusão de sangue infectado, transplante de órgão infectado, ingestão de alimentos e bebidas contaminados com as fezes dos triatomíneos ou o próprio inseto macerado presente no alimento no momento do processamento, transmissão congênita e transmissão por ingestão do leite materno (DIAS et al., 2011).

Os insetos que desempenham a função de vetor do *T. cruzi* pertencem à subfamília Triatominae, gênero *Triatoma*. Diversas espécies desse grupo já foram identificadas como vetores do parasita. Essas espécies apresentam variação na capacidade de transmissão do *T. cruzi* para mamíferos, uma vez que o parasita não consegue se transformar na forma metacíclica infectiva em número efetivo em alguns vetores como, por exemplo, *T. pseudomaculata*, espécie que apresenta uma taxa de transformação de aproximadamente 10% dos parasitas, enquanto espécies como *T. infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* podem transformar de 60 a 70% dos parasitas no seu trato digestivo na forma infectante para animais vertebrados (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012). No Brasil, a principal espécie envolvida na transmissão do parasita é o *Triatoma infestans* (PEREIRA; NAVARRO, 2013).

### **3. Ciclo do parasita no homem**

Após a entrada do parasita no organismo do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos são capazes de infectar um grande número de células nucleadas (TYLER; ENGMAN, 2001). As primeiras células infectadas estão presentes na região onde o parasita foi inoculado, são principalmente fibroblastos, macrófagos e células epiteliais. Esta invasão é dependente de interações entre diversas moléculas presentes na superfície da célula hospedeira e do parasita. O resultado desta interação leva a adesão do parasita à célula e em seguida sua internalização, dando início à fase intracelular do ciclo do *T. cruzi* (SOUZA et al., 2010).

O parasita faz uso de diversas estratégias utilizando mecanismos diferentes da célula hospedeira para infectá-la. Algumas das formas de invasão são o mecanismo de fagocitose, endocitose por meio de *rafts* de membrana, macropinocitose e endocitose mediada por clatrina (BARRIAS et al., 2013).



Independentemente da estratégia de entrada do parasita, o processo de invasão culmina com o parasita sendo encerrado em um vacúolo parasitóforo (VP) (BARRIAS et al., 2013). Dentro do VP o tripomastigota libera enzimas como transialidase e neuramidase que removem resíduos de ácido siálico da membrana do VP, tornando-a sensível à ação do Tc-Tox, um peptídeo que guarda homologia como fator 9 do sistema complemento em seres humanos. Com a acidificação do VP esse peptídeo começa a destruir a membrana do mesmo, a destruição do VP pode ser decorrente de formação de poros na membrana provocados pelo Tc-Tox (ANDREWS et al., 1989; ANDREWS et al., 1990; LEY et al., 1990; SOUZA et al., 2010). O tripomastigota se transforma em amastigota, ocorre a lise do VP e em contato com o ambiente citoplasmático inicia o processo de divisão. Os amastigotas se transformam em tripomastigotas e rompem a membrana da célula hospedeira e a partir daí passam a infectar outras células ou são ingeridos por vetores, reiniciando o ciclo do parasita (TYLER; ENGMAN, 2001; SOUZA et al., 2010).

Após a infecção, a doença pode ser dividida em fase aguda e fase crônica (Figura 1). A primeira fase é na maioria dos casos assintomática. Os sintomas, quando existem, geralmente são caracterizados por aumento do fígado, baço e linfonodos, febres por longos períodos e edemas subcutâneos. A sintomatologia, quando a infecção é causada pelo vetor, apresenta sinais da entrada do parasita através da pele no sítio de infecção gerando o chagoma, eritema e edema da região. Caso o sítio de infecção seja em membrana mucosa ocular é possível visualizar um sinal clássico da fase aguda, o sinal de Romana (Figura 1), que consiste em um edema unilateral e indolor da pálpebra e tecidos perioculares (RASSI et al., 2012).

Alguns estudos sugerem que o controle da replicação do parasita na fase aguda é mediado por macrófagos, neutrófilos e células *natural killers* (VITELLI-AVELAR et al., 2005; DHIMAN et al., 2013) e que a produção de citocinas inflamatórias tem papel importante no controle da quantidade de parasitas (DUTRA et al., 2009). O organismo pode responder à infecção de três formas distintas e complementares que são a detecção direta e destruição do parasita por macrófagos e células dendríticas, ativação de uma resposta imune antígeno-específica do sistema imune desencadeada por fagócitos profissionais (macrófagos e células dendríticas) e a detecção do parasita por células de linhagem não hematopoiética, que são os principais alvos do parasita (TARLETON, 2007; POVEDA et al., 2014).

A fase crônica da doença se inicia entre dois e três meses após a infecção inicial e os sintomas de fase aguda, caso tenham surgido, desaparecem independentemente de ter sido feito o tratamento com drogas tripanocidas. Dos indivíduos infectados 30 a 40% desenvolvem

uma patologia específica vinculada à infecção geralmente de 10 a 30 anos após a entrada do parasita no organismo. As principais patologias são as cardiopatias e problemas com o trato digestivo (megaesôfago e megacólon) (RASSI et al., 2010). As manifestações desses quadros clínicos estão diretamente vinculados à ocorrência de respostas inflamatórias nos tecidos lesionados (DUTRA et al., 2009).

Existem duas hipóteses que justificam a evolução da doença de Chagas para a cronicidade. A primeira defende a persistência do parasita no organismo hospedeiro como a causa das patologias características da fase crônica. A outra credita as lesões tissulares de órgãos afetados a uma resposta autoimune do hospedeiro (KIERSZENBAUM, 2005; HYLAND; ENGMAN, 2006, DUTRA; GOLLOB, 2008).

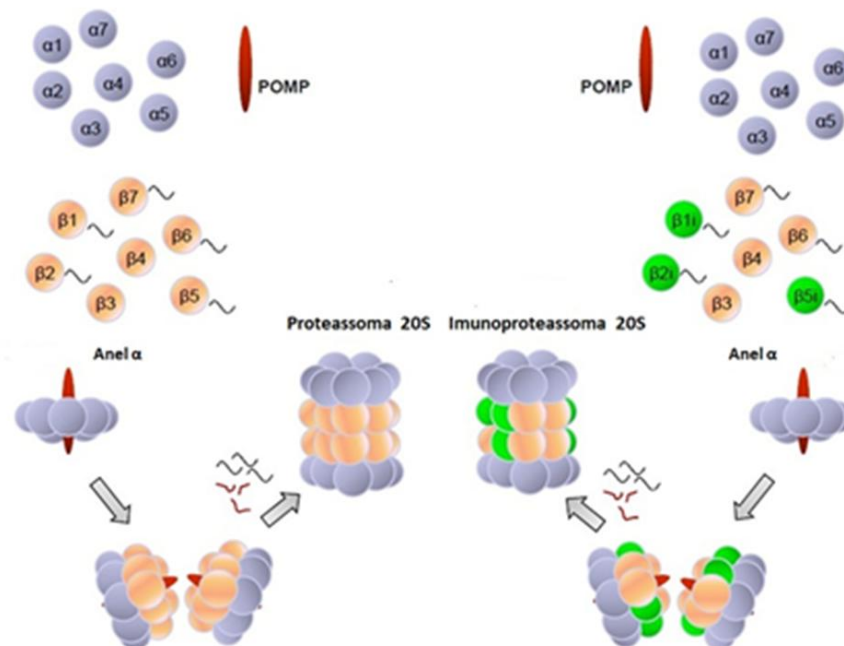
Estudos como o apresentado por Poveda et al. (2014) corroboram a ideia de que concentrações mais elevadas de citocinas inflamatórias e baixa concentração de citocinas anti-inflamatórias em indivíduos infectados estão vinculadas a casos de cardiomiopatia, enquanto indivíduos infectados que apresentam uma concentração menor dessas citocinas e um nível mais elevado de citocinas anti-inflamatórias não apresentavam o quadro clínico. Essa segunda situação caracteriza o que seria considerado a situação ideal para a sobrevivência do hospedeiro e do parasita e é o que ocorre em indivíduos infectados com quadro clínico inespecífico. Nesse caso existe um equilíbrio entre o número de parasitas existentes no organismo e a resposta imunológica do hospedeiro (DUTRA et al., 2009).

#### **4. Proteassoma, imunoproteassoma e a infecção por *T. cruzi***

O sistema ubiquitina/proteassoma presente em células eucarióticas auxilia na manutenção da homeostase celular, sendo o principal responsável pela degradação de proteínas citosólicas e nucleares em pequenos peptídeos que depois são degradados em aminoácidos utilizados na síntese *de novo* de proteínas. O sistema também atua na desconstrução de proteínas alteradas ou com problemas de dobramento e é um regulador essencial em processos celulares irreversíveis, como a apresentação de antígenos, diferenciação e crescimento celular e adaptação metabólica (GROLL; POTTS, 2011).

O proteassoma é um complexo multicatalítico que exerce a função de protease e é encontrado no núcleo e no citoplasma de células eucarióticas. O núcleo 20S do complexo tem massa de 700 kDa e é composto por 28 subunidades proteicas que se organizam em quatro anéis heptaméricos gerando um formato cilíndrico composto por quatro anéis que dão à essa estrutura dimensões de 160 Å de comprimento e 120 Å de diâmetro (Figura 2). Dois anéis

externos são idênticos e compostos por sete subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 1$ -  $\alpha 7$ ) diferentes. Os dois anéis internos são idênticos e compostos por sete subunidades  $\beta$  diferentes ( $\beta 1$  -  $\beta 7$ ) que circundam a câmara central desta estrutura, região onde três dessas subunidades  $\beta$  (1, 2 e 5) realizam a proteólise (MOREL et al., 2010; GROLL; POTTS, 2011).



**Figura 2.** Estrutura do proteassoma e imunoproteassoma. Montagem do proteassoma e imunoproteassoma, onde é ilustrada a mudança nas subunidades  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$ ). Modificado de Lee e Kim (2011).

Em organismos eucarióticos já foram observadas diferenças na clivagem proteica, que são determinadas pela composição de cada sítio de ligação das unidades proteolíticas. A subunidade  $\beta 1$  faz a clivagem tipo peptidil-glutamil hidrolase (*caspase - like*), clivando peptídeos após resíduos de aminoácidos ácidos; a subunidade  $\beta 2$  realiza clivagens tipo tripsina, que faz a clivagem preferencialmente após os resíduos de aminoácidos básicos; a subunidade  $\beta 5$  faz clivagem tipo quimotripsina, clivando o peptídeo após resíduos hidrofóbicos (BOCHTLER et al., 1999; ORLOWSKI; WILK, 2000; GLICKMAN; CIECHANOVER, 2002; GROLL; HUBER, 2003)

A célula na presença da citocina interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) é induzida a trocar suas subunidades catalíticas ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$ ) por seus homólogos,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$  respectivamente. Essas novas subunidades tornam o proteassoma mais eficiente no processamento de peptídeos antigênicos, uma vez que há redução na clivagem de peptídeos logo após aminoácidos ácidos e aumentam a produção de peptídeos que apresentam extremidade hidrofóbica e básica,

características identificadas em resíduos que se ligam de forma mais eficiente às moléculas MHC classe I (ROCK; GOLDBERG, 1999; MOREL et al., 2010). A subunidade  $\beta 1i$  passa a reprimir seletivamente a clivagem após resíduos ácidos e aumenta a de resíduos hidrofóbicos; a subunidade  $\beta 2i$  cliva especificamente após resíduos básicos; a subunidade  $\beta 5i$  cliva após resíduos hidrofóbicos (GACZYNSKA et al., 1993; GACZYNSKA et al., 1994, ORLOWSKI et al., 2000; GROETTRUP et al., 2001; BOSE et al., 2001). Por esse motivo, o proteassoma passa a ser denominado imunoproteassoma.

Uma vez induzida a montagem do imunoproteassoma ocorre o aumento da expressão das subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$ . Em resposta aos sinais de inflamação também há a produção de uma proteína que auxilia na montagem do imunoproteassoma denominada POMP (Proteína de Maturação do Proteasoma) ou Ump1 (Fator de Maturação do Proteassoma). Esta proteína auxiliar apresenta maior afinidade com a subunidade  $\beta 5i$  do que com a  $\beta 5$  e como resultado a célula passa a produzir preferencialmente o imunoproteassoma ao invés do proteassoma. Após a montagem do imunoproteassoma a proteína POMP é degradada (LEE; KIM, 2011).

Os peptídeos antigênicos gerados pelo imunoproteassoma são transportados para o lúmen do retículo endoplasmático por um transportador associado a processamento de antígenos (TAP) onde passa por processamento adicional e é ligado a uma molécula MHC I recém-sintetizada. O peptídeo ligado à molécula MHC I é então enviado para a membrana celular, onde é utilizado como estímulo para a ativação de linfócitos T citotóxicos ( $T\ CD8^+$ ), célula que participa no controle da infecção e é encontrada em grande número em sítios de infecção do parasita. A presença abundante de linfócitos  $T\ CD8^+$  é importante no controle da replicação do parasita, mas também é apontada como um dos responsáveis pela destruição de tecidos do hospedeiro ao induzir a morte das células presentes no local (CHEMALI et al., 2011; HUTCHINSON et al., 2011; PADILLA et al., 2011).

## **5. Regulação pós- transcricional - Regiões não traduzidas do RNA (3' e 5' UTR)**

O controle pós-transcricional é um componente indispensável na manutenção da homeostase celular e do organismo. Por meio deste controle é possível fazer a manutenção da eficiência do mRNA e assim modular a expressão de diversos genes que respondem à estímulos endógenos ou exógenos, como hormônios, nutrientes e estresse (HERSHEY et al, 2012).

A maioria do mRNA produzido por células eucarióticas apresenta em média uma meia-vida de 2 horas, fazendo do controle pós-transcricional uma ferramenta de rápida regulação da eficiência de tradução do mRNA (RAGHAVAN et al., 2002).

Os mecanismos de regulação apresentam espectro de ação diferentes, onde um mecanismo pode afetar a tradução de um único mRNA, um grupo ou a maioria dos mRNAs presentes. Regulações que envolvem um maior número de moléculas de mRNA geralmente ocorrem por meio de ativação ou inibição de um ou mais componentes do maquinário de tradução. Regulações mais específicas geralmente ocorrem por meio da ação de proteínas *trans*, que afetam a taxa de iniciação da tradução ao reconhecer e se ligar a sítios presentes na região 3' não traduzida de alguns mRNAs específicos, interferindo no processo. Outras formas de regulação são realizadas por meio de microRNAs que se ligam a elementos *cis* no mRNA. Esses elementos são grampos e pseudo-nós, estruturas intramoleculares do mRNA que apresentam a capacidade de interferir na tradução sem a necessidade de fatores de ligação. Essas estruturas são conhecidas por afetar a iniciação da tradução principalmente quando ocorrem na região 5' UTR; Sequências internas de acesso para ribossomo (IRES) ocorrem na maioria das vezes em 5' UTR e coexiste com o CAP 5', conferindo o potencial de tradução para a molécula de mRNA em situações onde a tradução dependente de CAP é comprometida, como situações de estresse celular e apoptose; uORFS (*upstream open reading frames*) estão presentes em 5' UTR de vários mRNAs e geralmente fazem inibição da tradução (GEBAUER et al. 2012; HERSHEY et al, 2012; ROUX; TOPISIROVIC, 2012).

Em células eucarióticas, o transcrito primário (pré-mRNA) passa por uma série de processamentos antes de ser carregado para o citosol onde será traduzido em proteína. Esse processamento envolve a remoção de introns por splicing, adição da estrutura Cap na extremidade 5', corte e poliadenilação da extremidade 3', definindo as regiões 5' e 3' UTR do mRNA maduro (MATOULKOVA et al, 2012).

A tradução do mRNA em proteína de forma simplificada apresenta 3 passos principais: iniciação (montagem da estrutura ribossômica na plataforma de mRNA), alongamento da cadeia de polipeptídeos (a síntese proteica) e terminação (a estrutura ribossômica é desmontada). Acredita-se que a fase de iniciação seja a fase mais regulada de todo o processo, com base no principal modelo para iniciação da síntese de proteína em células eucarióticas conhecido como mecanismo de *scanning*. O complexo ribossômico 43S se ligar ao nucleotídeo análogo a Cap presente na extremidade 5' do mRNA e inicia a varredura da região 5' UTR até localizar o códon de iniciação AUG e libera os fatores de

iniciação (eIFs) e recruta a subunidade 60S para formar a estrutura ribossômica ativa (80S), dando início à síntese de proteína (BUGAUT; BALASUBRAMANIAN, 2012).

Alguns mRNAs apresentam outra forma de iniciação da tradução que não envolvem um nucleotídeo análogo à Cap, fazendo uso de sítios de acesso interno para ribossomos (IRES) (BAIRD et al., 2006). Esse mecanismo faz uso de regiões não codantes e estruturas presentes no mRNA que substituem o Cap 5' e alguns eIFs (BUGAUT; BALASUBRAMANIAN, 2012).

As regiões não traduzidas do mRNA (UTR) são sequências que estão diretamente vinculadas ao controle da expressão gênica, tendo forte impacto no controle pós transcricional do mesmo. Juntamente com outros fatores de interferência no RNA, essas regiões UTR regulam a estabilidade, a exportação para o citoplasma, a localização subcelular e a eficiência de tradução desta molécula, influenciando na quantidade de proteína sintetizada. Essas funções vinculadas às regiões não traduzidas do RNA as tornam alvos importantes na intervenção da síntese proteica (MATOULKOVA et al, 2012).

A regulação da transcrição por meio de UTR é feita por diversos mecanismos como o uso de proteínas de ligação específica ao RNA, que interagem com sequências de nucleotídeos localizados nas regiões 5' e 3' UTR. Essas proteínas são capazes de estabilizar/desestabilizar a molécula e/ou inibir/estimular sua tradução. Interações entre RNAs complementares específicos não codantes e sequências específicas localizadas nestas regiões também tem papel relevante no controle pós-transcricional. Sequências repetitivas presentes no RNA também são utilizadas na regulação pós-transcricional. Um exemplo são as proteínas ligantes à CUG, que se ligam a repetições de CUG presentes na região 5' de alguns mRNAs, afetando a eficiência da transcrição. Outro mecanismo de regulação é o uso de moléculas de RNA de interferência (iRNA), que são agentes tipicamente repressores da tradução e indutores da degradação do mRNA (MIGNONE et al, 2002; IVANOV; ANDERSON, 2013).

De forma geral, o tamanho da região 3' UTR está inversamente correlacionada com a estabilidade do mRNA, a proliferação celular e a taxa de expressão gênica. Deste modo, mRNAs que apresentam uma região 3' UTR curta apresentam maior estabilidade, uma maior capacidade de transcrição e um maior potencial para tradução. Isso porque a região 3' UTR curta evade mecanismos que degradam 3'UTRs longos. Essas regiões mais curtas também apresentam poucos sítios para ligação de mRNAs, sofrendo menos interferências no processo de tradução (SANDBERG et al., 2008; MATOULKOVA et al., 2012).

As moléculas de RNA são estruturas relativamente maleáveis e podem se dobrar intramolecularmente e formar uma grande variedade de estruturas que determinam a função da molécula. Um exemplo é a formação de estruturas secundárias e terciárias presentes nas regiões UTR do mRNA, que já foi demonstrada como um fator importante na regulação pós-transcricional (CHATTERJEE; PAL, 2009; BUGAUT; BALASUBRAMANIAN, 2012). Uma destas estruturas é o quadruplex – G (G4), formada por 4 guaninas organizadas na forma de um quadrado plano cíclico. O G4 formado no RNA é uma isoforma mais estável do que as presentes no DNA (BUGAUT; BALASUBRAMANIAN, 2012) e em eucariotos as estruturas G4 do RNA são encontradas com frequência em mRNAs. Beaudoin e Perreault (2010) analisaram transcritos do banco de dados de UTRs humano completo (124.315 transcritos) e conseguiram identificar aproximadamente 9.979 regiões 5' UTR que apresentam pelo menos uma sequência G4 (SONG et al., 2016).

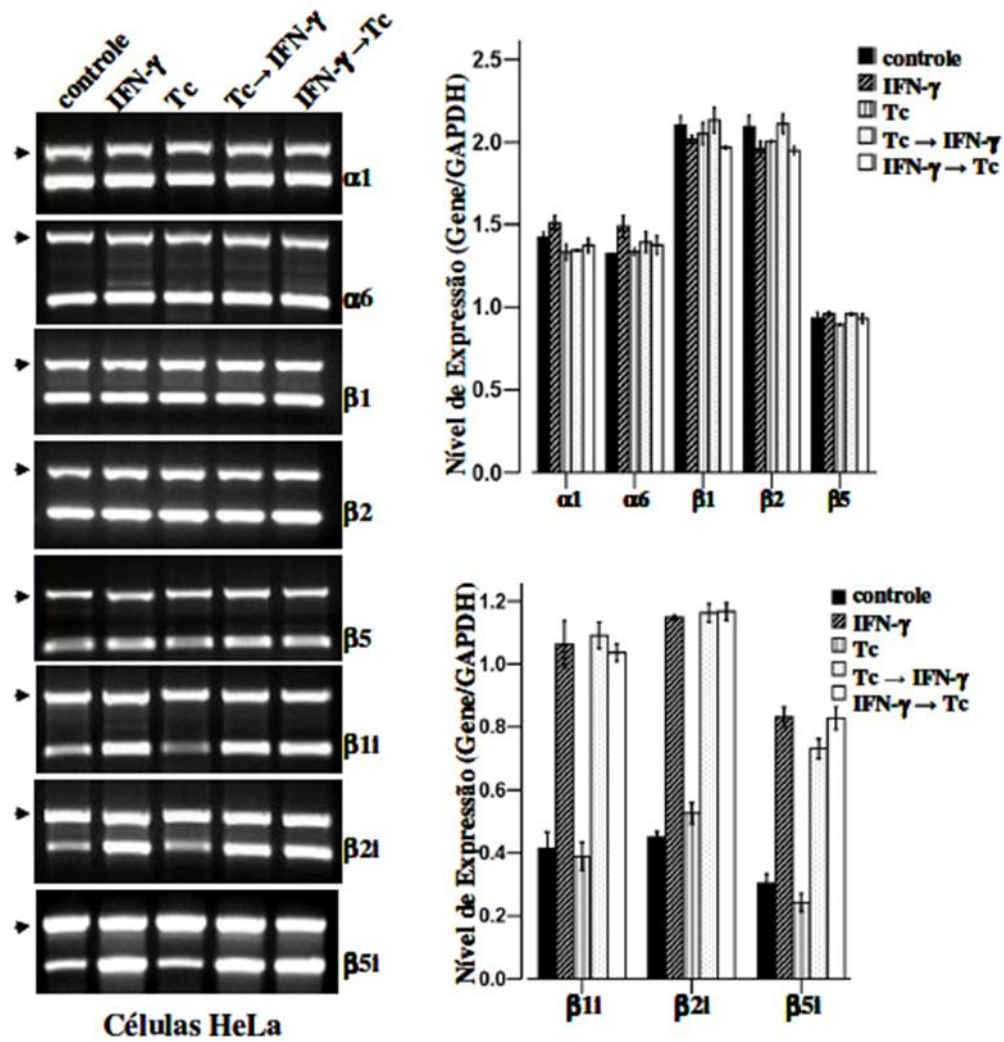
Dados obtidos em estudos (KUMARI, et al, 2007; ARORA; SUESS, 2011; WOLFE, et al., 2014) demonstram que o posicionamento do quadruplex – G nas regiões 5' e 3' UTR podem ter função inibitória ou estimulante da tradução da molécula.

## 6. Justificativa

Maçaneiro (2009) (Figura 3) e Camargo et al. (2014) (Figuras 4 e 5) avaliaram a expressão e a atividade proteolítica do proteassoma e do imunoproteassoma e a expressão MHC I em células HeLa infectadas com *T. cruzi*. Para isso as células HeLa foram cultivadas em cinco grupos onde o primeiro foi sem tratamento (controle); o segundo foi estimulado por 24 horas com IFN- $\gamma$ ; o terceiro as células foram expostas aos tripomastigotas por 24 horas; o quarto células foram expostas aos tripomastigotas por 24 horas e em seguida tratadas com IFN- $\gamma$  por 24 horas e o quinto grupo foi estimulado por 24 horas com IFN- $\gamma$  e em seguida exposto aos tripomastigotas por 24 horas. Por meio de análises desses grupos através de técnicas como transcrição reversa seguida de reação de polimerização em cadeia (RT-PCR) (Figura 3) e transcrição reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR) (Figura 4), *western blotting* (Figura 5) e citometria de fluxo, foi demonstrado que a presença do parasita *T. cruzi* atuava como um fator inibitório na tradução dos mRNAs para as subunidades  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$ ,  $\beta 5i$  e PA28 $\beta$ , a proteína TAP1 e o receptor MHC I, uma vez que foi observada a presença do mRNA dos mesmos, porém uma baixa concentração de suas proteínas.

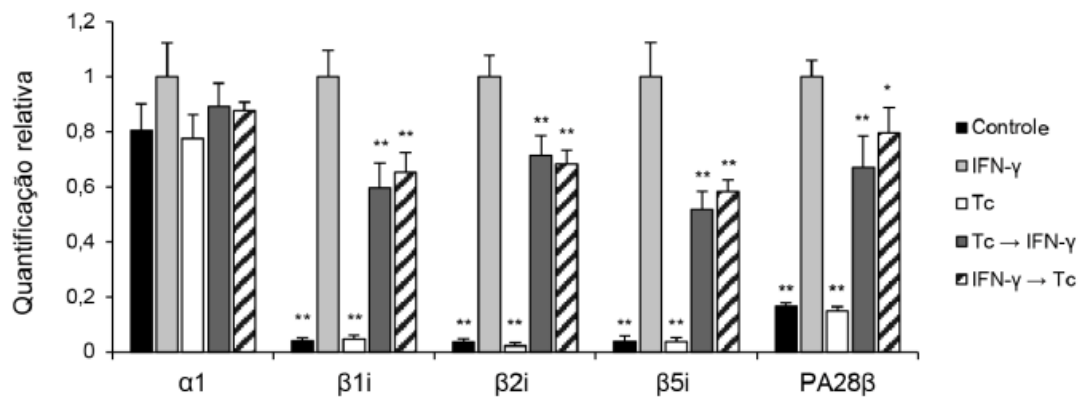
Os trabalhos de Maçaneiro (2009) e Camargo et al. (2014) demonstram a existência de um fator interferente pós-transcricional dessas subunidades catalíticas do imunoproteassoma,

bem como de TAP1 e MHC I, sendo necessários outros estudos para desvendar como se dá esse processo de interferência na expressão dessas moléculas, quais os alvos para inibição utilizados pelo *T. cruzi* e quais são as moléculas utilizadas pelo parasita para isso.

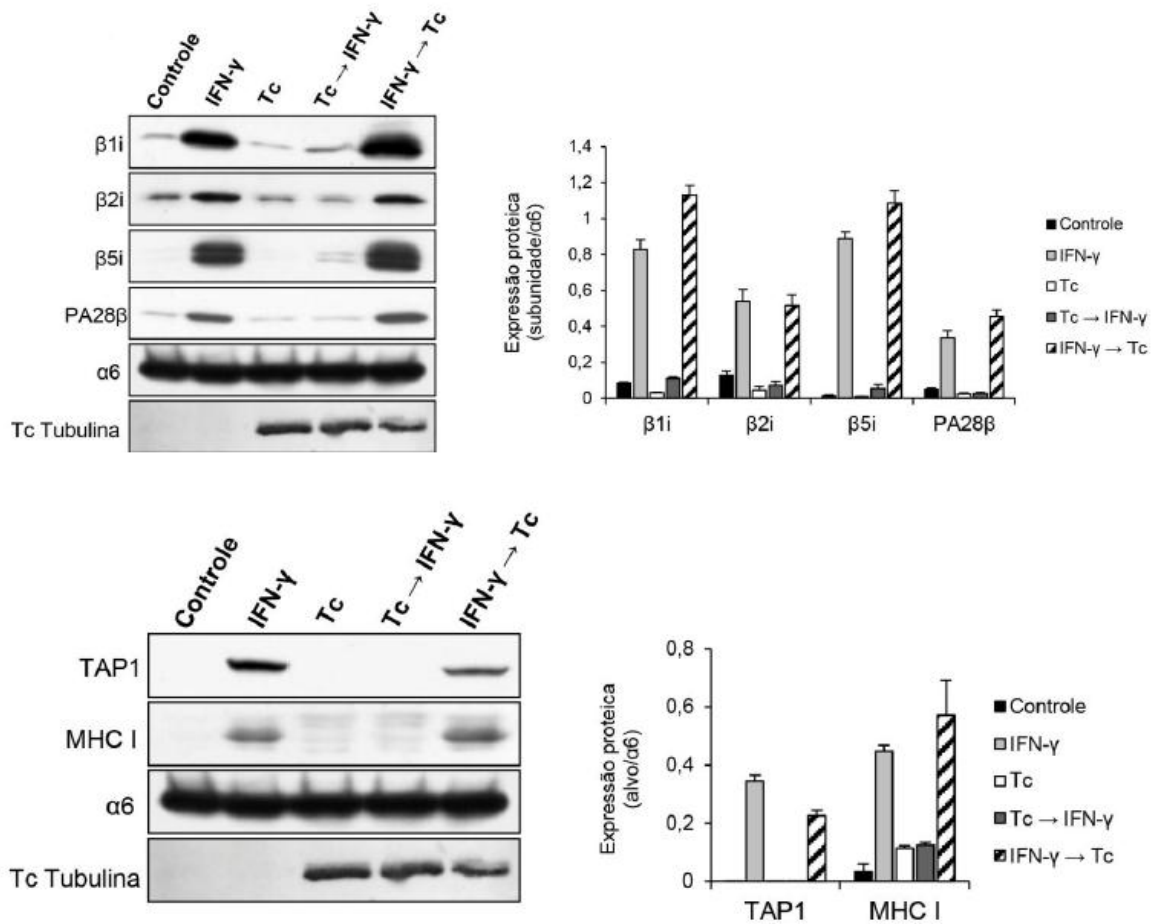


**Figura 3.** Quantificação do mRNA de subunidades do proteassoma/imunoproteassoma em células HeLa expostas a diversos tratamentos por meio de PCR semi quantitativo (MAÇANEIRO, 2009).





**Figura 4.** Quantificação do mRNA de subunidades do proteassoma/imunoproteassoma em células HeLa expostas a diversos tratamentos por meio de PCR em tempo real (CAMARGO et al., 2014).



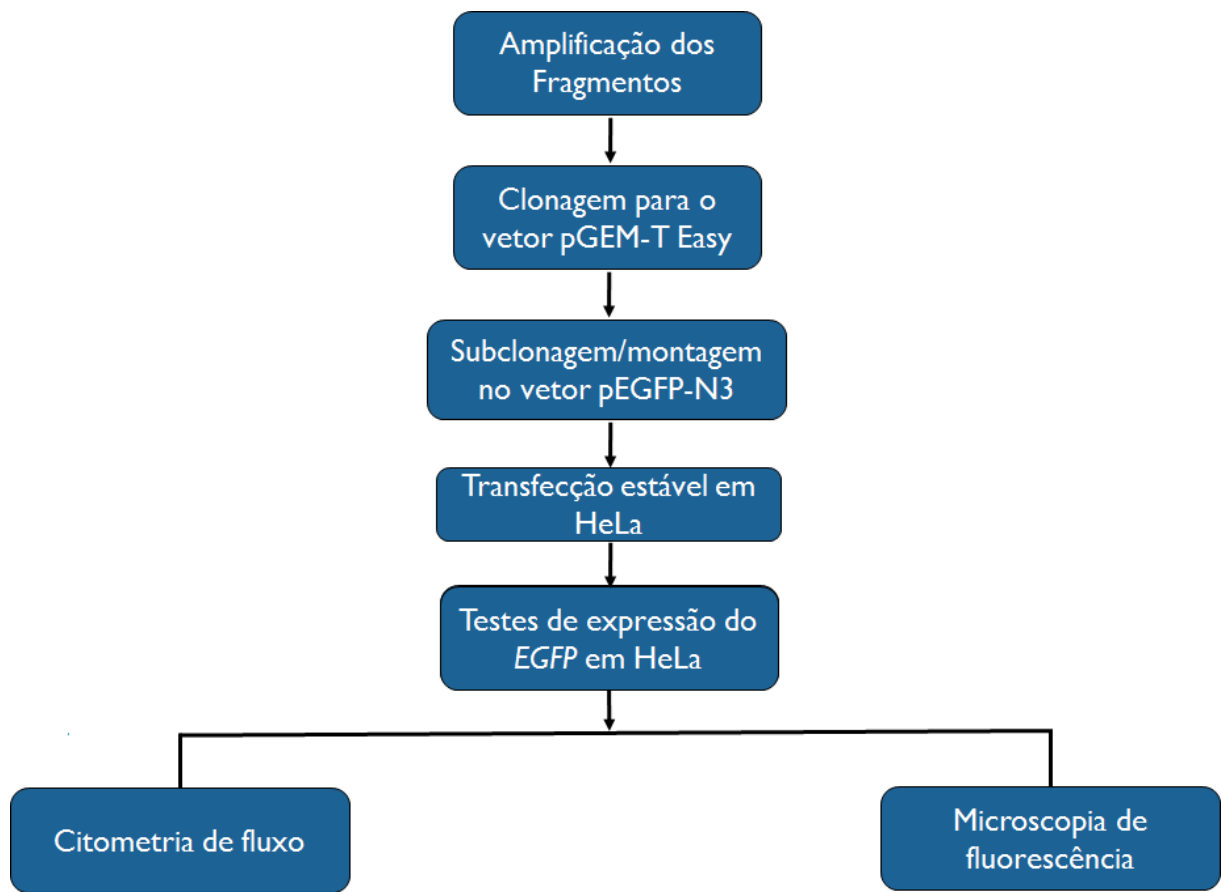
**Figura 5.** Western blot para avaliar a expressão das subunidades induzidas do imunoproteassoma, a molécula MHC I e a proteína TAP1 (CAMARGO et al., 2014).

## OBJETIVOS

O objetivo do estudo foi avaliar o papel do parasita *Trypanosoma cruzi* na inibição da expressão no nível pós-transcricional da subunidade  $\beta$ 1i do imunoproteassoma de células HeLa durante o processo infeccioso.

Para tal, avaliamos se as regiões 5' e 3' não traduzidas do mRNA da subunidade  $\beta$ 1i estão envolvidas na inibição da expressão dessa subunidade durante a infecção pelo *T. cruzi* em sistema utilizando o gene para proteína verde fluorescente (*EGFP*) como repórter e experimentos de transfecção e infecção.

## DESENHO EXPERIMENTAL



# MATERIAL E MÉTODOS

## 1. Material

### 1.1. Soluções e Tampões

#### 1.1.1. PBS (1X)

NaCl 137 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 mM; KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM

A esterilização foi realizada em autoclave por 20 min a 120°C.

#### 1.1.2. Verseno-tripsina

Tripsina 0,1 %; PBS 1X; EDTA 2 mM

#### 1.1.3. Tampão hipotônico para lise celular

NaCl 10 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,5; MgCl<sub>2</sub> 5 mM

#### 1.1.4. Solução de extração I

Glucose 50 mM; Tris-HCl 25 mM (pH 8,0); EDTA 10 mM (pH 8,0)

#### 1.1.5. Solução de extração II

NaOH 0,2 M; SDS 1%

#### 1.1.6. Solução de extração III

Acetato de potássio 5 M; Ácido acético glacial 11,5 mL

#### 1.1.7. Meio Luria-Bertani (LB)

NaOH 1%; Extrato de Levedura 0,5%; Triptona 1%

#### 1.1.8. Meio 2YT

Triptona 1,6 %; Extrato de levedura 1,0 %, NaCl 0,5 %.

Ajustar o pH para 7,0 com NaOH e esterilizar em autoclave por 15 min.

#### 1.1.9. Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*)

NaCl 0,4%; KCl 0,4%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,8%; glicose 0,2%; Triptose 0,5%; Infuso de

fígado 0,5%; água destilada q.s.p 1 L.

#### 1.1.10 Meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* – Life Technologies)

13,4 g; Piruvato de sódio 0,11 g; Bicarbonato de Sódio 3,7 g; Água destilada qsp. 900 mL.

### 1.2. Soluções para géis de agarose

#### 1.2.1. Tampão TBE (10X)

Tris Base 0,89 M; Ácido Bórico 0,89 M; EDTA 0,02 M

#### 1.2.2. Tampão de amostra (10X)

TBE 10X; Glicerol 50%; Azul de Bromofenol 0,01%; Xileno Cianol 0,01%

#### 1.2.3. Brometo de Etídeo

Solução estoque: 10 mg/mL em H<sub>2</sub>O Milli Q.

### 1.3. Linhagens celulares

Para esse trabalho, foram utilizadas células humanas advindas de tumor cervical denominadas HeLa (LUCEY et al., 2009)

Para as infecções, foram utilizadas células de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) na forma tripomastigota (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953).

As clonagens foram realizadas utilizando células da bactéria *Escherichia coli* DH 5α.

### 1.4. Oligonucleotídeos para a reação de polimerização em cadeia (PCR)

Os iniciadores de oligonucleotídeos para as sequências 5' UTR/ $\beta$ 1i e 3' UTR/ $\beta$ 1i da subunidade  $\beta$ 1i do imunoproteassoma de células HeLa, bem como a sequência codificadora do gene para proteína EGFP foram desenhados por nós com base em suas sequências presentes no banco do GenBank e estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Descrição	Sequência 5' - 3'	TM
PR570	HsB1i primer 5' do 5'UTR + NheI	GTAGCTAGCGCGCGTTGTGCGCTGTC	58°C
PR571	HsB1i primer 3' do 5'UTR +BamHI	CTTGGATCCCCCTGCAAGGCACCGCT	58°C
PR572	EGFP primer 5' + BamHI	TTGGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG	58°C
PR573	EGFP primer 3' + HindIII	GTCTAAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCA	58°C
PR574	HsB1i primer 5' do 3'UTR + HindIII	TATTAAGCTTACCTTCCCCAGACTTCTCT	58°C
PR575	HsB1i primer 3' do 3'UTR + NotI	GCTGCGGCCGCTTGCGGCCTCATCATCATG	58°C

### 1.5. Enzimas de restrição

As enzimas utilizadas na digestão dos vetores e sequências alvo foram: BamHI (Biolabs), Pst I (Biolabs), HindIII (Biolabs), Not I (Biolabs) e EcoRI (Promega);

### 1.6. Meio de cultura para células HeLa

Meio DMEM (Material 1.1.10), o pH do meio foi ajustado para 7,2 com HCl concentrado e então esterilizado por filtração em filtro Millipore 0,22 µm. Após a esterilização, o meio foi distribuído assepticamente em garrafas previamente esterilizadas e armazenado a 4°C.

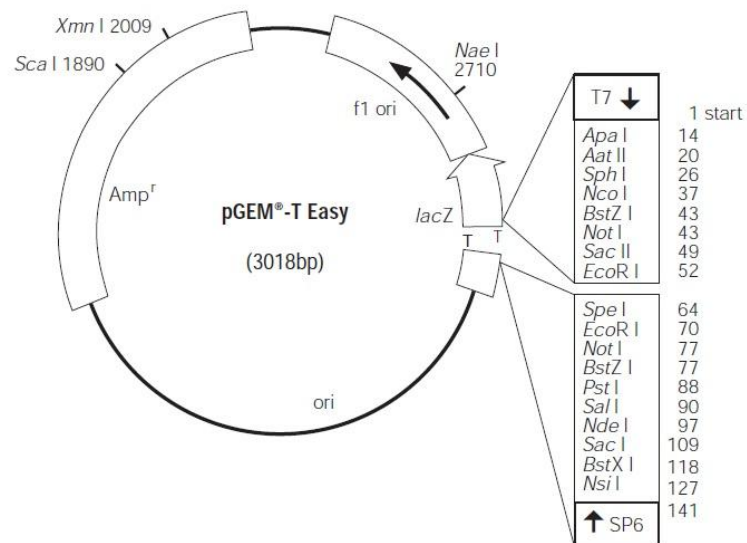
No momento de uso, foram acrescentados antibióticos (penicilina 100 U/mL e 100 µL/mL de estreptomicina (Pen Strep (Gibco/Life Technologies)) e o meio foi suplementado com 10% do volume de meio com soro fetal bovino (Gibco/Life Technologies).

### 1.7. Meio de cultura para *Escherichia coli*

As células competentes transformadas foram cultivadas em meio LB (Luria Bertani) sólido e líquido autoclavados a 120°C por 20 min antes do uso.

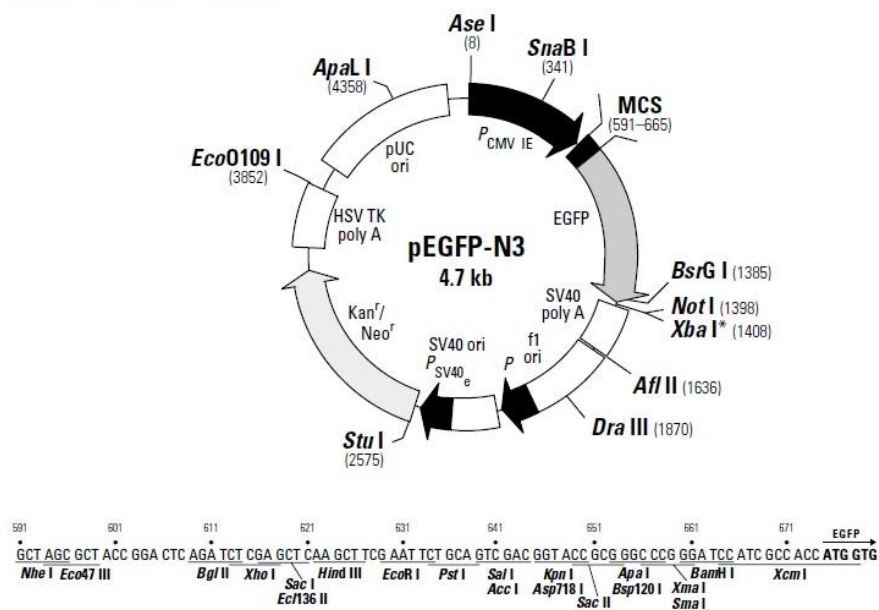
### 1.9. Vetores de clonagem

Para a clonagem das sequências de DNA desejadas, foram utilizados os vetores pGEM®-T Easy (Promega) (Figura 6) e pEGFP-N3 (Clontech) (Figura 7).



**Figura 6.** Mapa físico do vetor pGEM®-T Easy (Promega)

GenBank Accession #: U57609



**Figura 7.** Mapa físico do vetor pEGFP-N3 (Clontech).

## 2. Métodos

### 2.1. Cultura de células HeLa

Para a obtenção de células viáveis para a execução do estudo proposto foi realizada a semeadura de  $3,0 \times 10^6$  células em garrafas de 80 cm<sup>2</sup> com meio DMEM (Gibco, LifeTechnologies) e incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o crescimento por um período de 24 a 48 h, as células foram descoladas da garrafa com Verseno-Tripsina (0,1%) (Material e Métodos, item 1.1.2), a ação da enzima foi interrompida ao acrescentar o meio DMEM. Após a ressuspensão, as células foram contadas câmara de Neubauer e em seguida transferidas para os poços das placas de cultura de células (24 ou 96 poços) na quantidade desejada por poço para a realização dos testes.

### 2.2. Obtenção de tripomastigotas cepa Y

Os tripomastigotas utilizados no estudo foram obtidos a partir da infecção de culturas de células HeLa na concentração de  $3,0 \times 10^6$  células por garrafa de cultura de 80 cm<sup>2</sup> com tripomastigotas na proporção de 40 parasitas para cada célula, seguida da incubação das células a 37°C a uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

A eclosão dos primeiros tripomastigotas a partir de 96 horas após a infecção inicial e os parasitas obtidos foram armazenados a -80°C em meio de congelamento (DMEM + DMSO a 10%) até o momento do uso.

### 2.3 Oligonucleotídeos e a reação em cadeia da polimerase

Para a reação de amplificação das sequências desejadas (regiões 5' e 3' UTR do *βli* do imunoproteossoma e o gene *EGFP*) foram utilizados por reação 3 µL de tampão PCR 10X, 0,6 µL de solução de dNTP a 10 mM cada, 0,9 µL de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, 0,5 µL de cada primer a 10 µM, 1 µL (10 ng/ µL) 0,2 µL de Platinum® TaqDNA polimerase (Invitrogen) a 5 U/µL, 23 µL de água Mili-Q e 1 µL da amostra (10 ng/µL), perfazendo um volume final de 30 µL.

As amostras mencionadas acima são sequências do gene *βli* do imunoproteossoma existentes no acervo do laboratório advindos de células HeLa e L6. A amostra utilizada para a amplificação do gene *EGFP* foi o próprio vetor pEGFP-N3.

A Tabela 1 presente no item 1.3 (Material e Métodos) mostra quais iniciadores foram utilizados na PCR das sequências de estudo. As amplificações foram feitas por meio do



seguinte programa: pré-ciclo de 1 min a 94°C; 35 ciclos de: 15 s de desnaturação a 94°C, 15 s de anelamento a 56°C, extensão a 72°C por 15 s (5' UTR/ $\beta$ li) e por 30 s (gene EGFP e 3' UTR/ $\beta$ li); e uma extensão final por 1 min a 72°C.

No preparo das montagens das sequências com os vetores para transfecção (Figura 12) os iniciadores foram utilizados aos pares da seguinte forma: PR570 com PR573, PR570 com PR575 e PR572 com PR575. Essa amplificação seguiu o programa e o sistema mencionados acima, com exceção do tempo de extensão, que foi de 45 seg.

#### **2.4. Ligação das amostras ao vetor pGEM-T Easy (Promega)**

As sequências amplificadas foram ligadas ao vetor pGEM-T Easy (Promega) utilizando-se o seguinte sistema: para ligação da sequência 5' UTR/  $\beta$ li, 2  $\mu$ L de tampão RapidLigation Buffer T4 DNA ligase, 1  $\mu$ L do vetor (50 ng), 2  $\mu$ L de amostra (3,5 ng) e 1  $\mu$ L da enzima DNA ligase (3 U/ $\mu$ L); para as amostras EGFP e 3' UTR/ $\beta$ li o sistema foi, 5  $\mu$ L de tampão RapidLigation Buffer T4 DNA ligase, 1  $\mu$ L do vetor (50 ng), 0,5  $\mu$ L de amostra (36 ng e 15,5 ng respectivamente) e 1  $\mu$ L da enzima T4 DNA ligase (3 U/ $\mu$ L). Os sistemas foram incubados por 18 h a 4°C. O volume final de todos os sistemas foi ajustado para 10  $\mu$ L com água ultra-pura.

#### **2.5. Transformação de *E. coli* e seleção de recombinantes**

Para a obtenção de cópias dos vetores contendo os fragmentos de estudo, células de *E.coli* da cepa DH 5 $\alpha$  foram transformadas seguindo o protocolo de Inoue et al. (1990) e transferidas posteriormente para placas de Petri com ágar LB contendo ampicilina a 100  $\mu$ g/mL, IPTG a 0,05 mM (isopropil-tio-galactosídeo) e X-gal a 0,004% (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo em dimetilformamida).

As placas foram incubadas em estufa a 37°C por um período de 18 h e três clones brancos foram inoculados e cultivados em 3,0 mL de meio LB ou 2YT acrescido de ampicilina sob agitação constante de 220 rpm por um período de 18 horas a 37°C.

#### **2.6. Minipreparação de plasmídeos por lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989)**

Após 18 horas de crescimento, as culturas foram transferidas para tubos Eppendorf (1,5 mL) e centrifugados por 10 min a 3.500 g. Em seguida o sobrenadante foi descartado e 100  $\mu$ L da solução I (Material, item 1.1.4) foi adicionada e as amostras ressuspensas. 200  $\mu$ L da solução II (Material, item 1.1.5) foram acrescentados e a amostra foi homogeneizada por

inversão e as amostras foram incubadas por 5 min em temperatura ambiente. Após esse período, 150 µL da solução III (Material, item 1.1.6) foram acrescentados às amostras e após homogeneização por inversão, os tubos foram centrifugados a 13.800 g por 20 min. Os sobrenadantes das amostras centrifugadas foram transferidos para um novo tubo e 400 µL de isopropanol foram acrescentados. Após homogeneização as amostras foram centrifugadas por 20 min a 13.800 g. Os tubos foram vertidos para a retirada do isopropanol e 1 mL de etanol a 70% foi acrescentado sem ressuspender o sedimento. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 5 min a 13.800 g.

O etanol foi retirado e os tubos mantidos abertos para secagem. Após esse período, o DNA foi ressuspensão em 40 µL de água Mili-Q® e 1 µL de RNase (10 mg/mL) por tubo Eppendorf) e armazenado a -20°C até o momento de uso.

### **2.7. Seleção dos plasmídeos pGEM-T Easy recombinantes**

Os mesmos sistemas de PCR do item 2.3 acima foram utilizados para a confirmação inicial da inserção dos fragmentos amplificados no vetor pGEM®-T Easy.

Em um primeiro momento, a seleção dos plasmídeos pGEM-T Easy contendo os fragmentos clonados foi realizada por digestão com a enzima EcoRI, com o seguinte sistema: 11,0 µL de água Milli-Q®, 1,5 µL de Tp H 10X (Promega), 2,0 µL de DNA plasmidial e 0,5 µL da enzima EcoRI (12 U/µL), perfazendo um volume final de 15 µL.

### **2.8. Digestão dos fragmentos com enzimas para os sítios de restrição inseridos às sequências amplificadas**

Para a confirmação da inserção dos sítios de restrição durante a amplificação das sequências as amostras foram digeridas da seguinte forma: plasmídeo pGEM-T Easy contendo o fragmento 5' UTR/β1i – enzimas PstI e BamHI; plasmídeo pGEM-T Easy contendo o fragmento do gene EGFP – enzimas HindIII e BamHI; plasmídeo pGEM-T Easy contendo o fragmento 3' UTR/β1i – enzimas HindIII e NotI; e plasmídeo pGEM-T Easy contendo o fragmento do gene *DsRed2* – enzimas Eco RI e Xho I. Os sistemas de reação foram realizados conforme indicação dos fabricantes das enzimas de restrição.

Uma vez confirmada a inserção dos sítios as amostras foram digeridas novamente em um volume maior de DNA para obter-se uma quantidade maior das sequências de estudo. O vetor pEGFP-N3 foi digerido para gerar as pontas coesivas para ligação com as amostras. As

amostras e o vetor foram digeridos em um sistema de volume final de 50 µL para serem purificados em seguida.

### **2.9. Purificação das amostras digeridas**

Os plasmídeos digeridos (50 µL) foram colocados em géis de agarose (2% para o plasmídeo contendo o fragmento 5' UTR/ $\beta$ li e 1 % para os demais) e após a eletroforese as bandas de interesse foram recortadas e colocadas em tubos Eppendorfs individuais e os fragmentos de DNA purificados com o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante.

### **2.10. Clonagem dos fragmentos-alvo no vetor pEGFP N-3**

Os fragmentos e vetores purificados como descrito acima no item 2.9 foram ligados de acordo com o ilustrado na Figura 12A para a montagem do gene *EGFP* às regiões 5' e 3' UTR.

Após a ligação, os sistemas foram transformados em células de *E. coli* de acordo com o descrito no item 2.4 dos Métodos, mas sem o acréscimo de X-gal e IPTG. Colônias foram escolhidas aleatoriamente das placas e transferidas para tubos contendo 3 mL de meio de 2YT adicionado de canamicina a 30 µg/mL e, após incubação a 37°C por 18h sob agitação a 220 rpm, tiveram os plasmídeos extraídos como descrito no item 2.5 dos Métodos e armazenados a -20°C até o momento de uso.

Os mesmos sistemas do item 2.3 acima foram utilizados para a confirmação inicial da inserção dos fragmentos subclonados no vetor pEGFP N-3.

A seleção dos plasmídeos recombinantes foi realizada por digestão com as enzimas de restrição respectivas de cada sistema e análise em gel de agarose.

### **2.11. Maxipreparação dos plasmídeos recombinantes para a transfecção**

Uma vez confirmada a ligação das sequências com os vetores, 500 µL das amostras crescidas em meio líquido (2YT) foram transferidas para frascos Erlenmeyers contendo 100 mL de meio 2YT contendo canamicina a 30 µg/mL e incubadas sob agitação a 37°C por 18 h. Após esse período de incubação, foi realizada a maxipreparação dos plasmídeos com o kit *Pure Link™ HiPurePlasmid DNA Purification* (Invitrogen), de acordo com o manual do fabricante.

### **2.12. Transfecção transiente de células HeLa**

As células de cultura HeLa foram cultivadas em garrafas de 75cm<sup>2</sup> por um período de 48 horas, quando foi feita a retirada de  $3,0 \times 10^6$  células e transferidas para uma nova garrafa de mesmo tamanho e mantidas por um período de 18 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, quando foram transferidas para uma placa de cultura de 96 poços sob uma concentração de  $3,0 \times 10^4$  células/poço.

Após um período de 24 h, as células foram transfectadas individualmente com os vetores com o kit de transfecção Lipofectamine® 3000 (Invitrogen), onde o DNA (0,2 µg/poço) foi preparado com DMEM e o reagente P3000 e misturado a um segundo tubo contendo DMEM e o reagente Lipofectamine® 3000. Após esse processo, o material foi colocado nos poços e sua análise foi realizada em um período de 24 a 72 h.

### **2.13. Avaliação da relação transfecção/infecção com a expressão do gene EGFP**

As células HeLa descongeladas foram cultivadas em garrafas de 75cm<sup>2</sup> por um período de 48 h, quando foi feita a retirada de  $3,0 \times 10^6$  células que foram transferidas para uma nova garrafa de mesmo tamanho e mantidas por um período de 18 horas, quando foram transferidas para uma placa de cultura de 24 poços, com uma lamínula de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> de diâmetro, sob uma concentração de  $5,0 \times 10^4$  células/poço.

Após um período de 18 h, 2 poços foram transfectados com o vetor portando todos os fragmentos enquanto outros 2 poços foram infectados com os tripomastigotas e a placa foi armazenadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 12 h. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e substituído por meio DMEM novo e os poços transfectados anteriormente foram infectados, os poços infectados foram transfectados e a placa voltou a ser armazenada sob as mesmas condições por um período de 24 h.

As amostras foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS 1x e marcadas com *ProLong Gold antifade reagent with DAPI* (Invitrogen) e observadas em microscópio.

### **2.14. Transfecção estável do EGFP em células HeLa**

O processo de obtenção e transfecção das células foi realizado como descrito em Material e Métodos (item 2.13).

Após 18 horas da realização da transfecção, o meio de cultura foi trocado, sendo substituído por um novo meio DMEM suplementado como descrito no item 1.6 em Material e Métodos contendo G418 na concentração de 400 µg/µL. As células foram mantidas a 37°C e

5% de CO<sub>2</sub> durante todo o período de cultura que antecedeu os testes de infecção com *T. cruzi*.

### **2.15 Avaliação da expressão do gene repórter EGFP em linhagens HeLa de transfecção estável**

As células transfectadas com o a montagem 3' UTR – EGFP – 5' UTR ou células controle (transfectadas com o vetor pEGFP N-3) foram transferidas para placas de 24 poços em uma concentração de  $0,3 \times 10^5$  células/poço. Antes do experimento, foram colocadas lamínulas de 13 mm nos poços utilizados para posterior microscopia. Após um período de 1 h para a fixação das células HeLa foram acrescentados tripomastigotas nos poços, sendo mantida a proporção de 50 parasitas por célula.

A infecção foi acompanhada por meio de microscopia ótica e, no quarto dia de infecção as mesmas foram retiradas dos poços e levadas para citometria. Os poços para microscopia foram lavados com PBS 1x e em seguida fixados com paraformaldeído 4% por 30 min. Após a fixação, as lamínulas foram retiradas dos poços e colocadas em lâminas limpas e marcadas com *ProLong Gold antifade reagent with DAPI* (Invitrogen).

### **2.16. Citometria de fluxo**

As células foram descoladas do fundo dos poços com a solução verseno-tripsina e transferidas para tubos de 1,5 mL e ressuspensas em 1 mL PBS 1x.

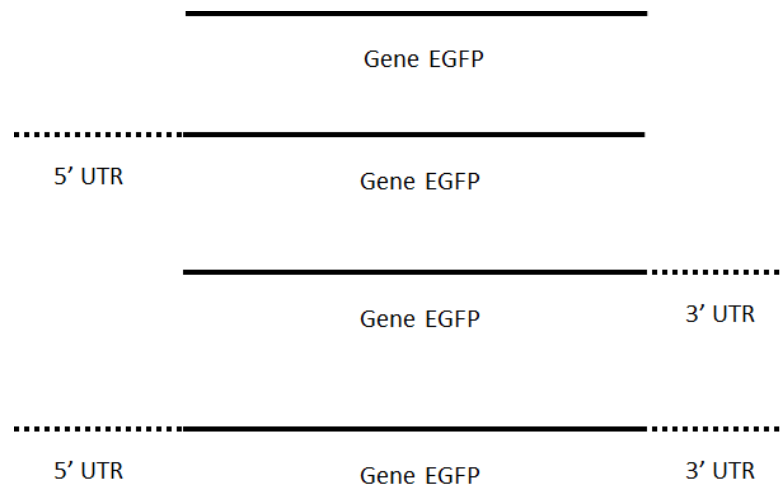
A análise por citometria de fluxo foi realizada no equipamento FACS Verse (BD Biosciences) e os dados gerados foram analisados no programa FACS Suite (BD Biosciences). Os gráficos foram gerados por meio do programa GraphPad Prism (Scientific Software). A expressão de *EGFP* foi avaliada pela intensidade de fluorescência (MFI) emitida pelas células.

### **2.17. Microscopia de fluorescência**

As células utilizadas nos experimentos de transfecção foram observadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse Ti expostas aos lasers para observação das fluorescências DAPI (excitação máxima = 358 nm; emissão máxima = 461) e EGFP (excitação máxima = 488 nm; emissão máxima = 507). A análise e as fotografias foram realizadas com lente objetiva 20x.

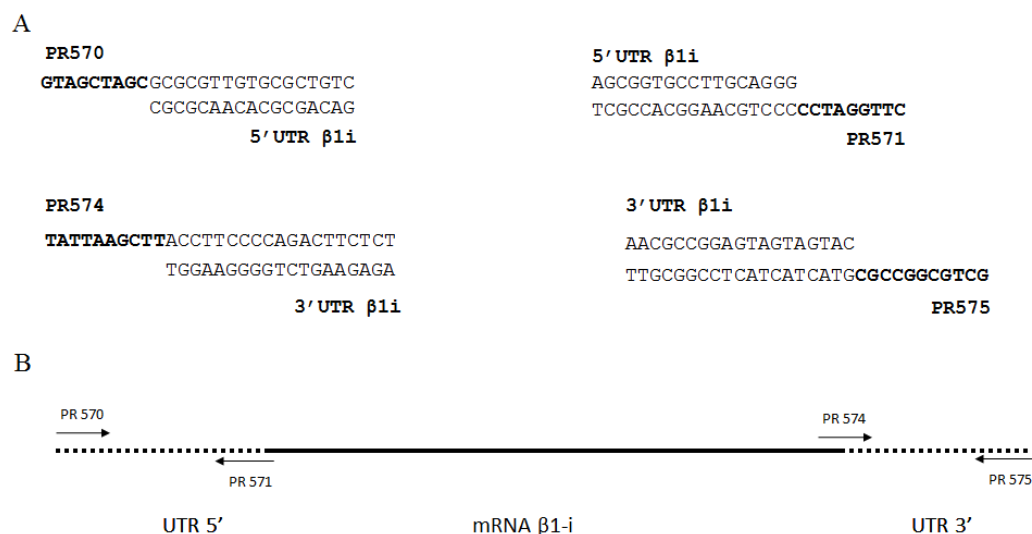
## RESULTADOS

Para avaliar se as regiões 5' e 3' não traduzidas do mRNA da subunidade  $\beta 1i$  estão envolvidas na inibição da expressão dessa subunidade durante a infecção pelo *T. cruzi*, em uma primeira etapa foi construído um sistema de expressão com o gene repórter da proteína verde fluorescente (EGFP), onde apenas a região 5'UTR/ $\beta 1i$  ou a 3'UTR/ $\beta 1i$  ou ambas estão presentes flanqueando a região gênica da EGFP (Figura 8).

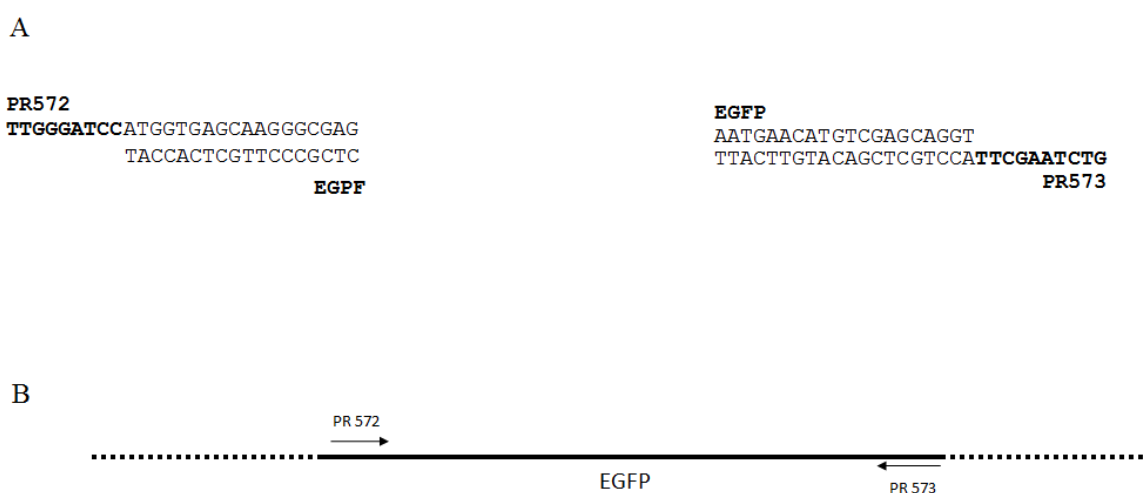


**Figura 8.** Esquema de montagens do gene *EGFP*. Construções para a avaliação da inibição da expressão do gene *EGFP*. Para a montagem do sistema, sequências de oligonucleotídeos foram planejadas com base na sequência das regiões 5' e 3' UTR/ $\beta 1i$  do mRNA da subunidade  $\beta 1i$  humana (GenBank, NM\_002800.4) do gene para a proteína EGFP do vetor pEGFP-N3 e adicionando sítios de restrição nas extremidades dos oligos (Figuras 6 e 7).

Para isso oligonucleotídeos foram utilizados (Tabela 1) para amplificação das regiões de estudo, onde o fragmento 5'UTR/ $\beta 1i$  apresenta 91 bp; fragmento 3'UTR/ $\beta 1i$  – 342 bp e fragmento gênico da EGFP – 743 bp.

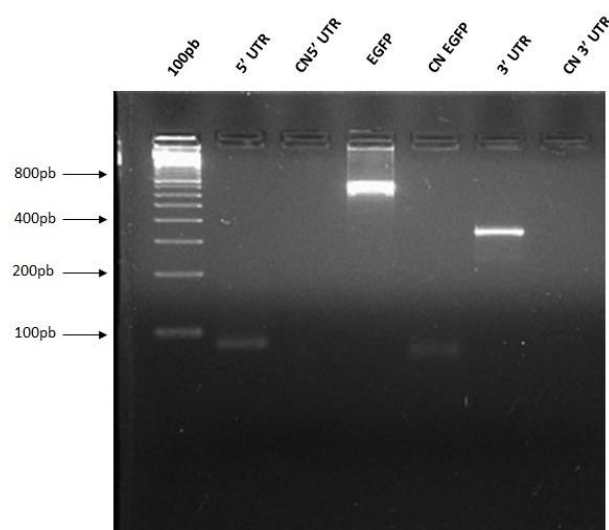


**Figura 9.** Estratégia para a amplificação das regiões 5' e 3' UTR do mRNA do gene  $\beta$ 1i humano. (A) O esquema ilustra os pontos de anelamento entre os iniciadores e as sequências alvo. As bases em negrito indicam os sítios de restrição e bases extras inseridos nas extremidades dos oligos. No oligo PR570 foi inserido o sítio para a enzima Nhe I; no PR571 foi inserido o sítio Bam HI; no PR574 foi inserido o sítio para a enzima Hin dIII e no PR575 foi inserido o sítio para a enzima Not I. (B) Esquema mostrando o mRNA da subunidade  $\beta$ 1i e os iniciadores para as regiões 5' e 3' UTR.



**Figura 10.** Estratégia para a amplificação do gene *EGFP*. (A) O esquema ilustra os pontos de anelamento entre os iniciadores projetados e as sequências alvo. As bases em negrito indicam os sítios de restrição e bases extras inseridos nas extremidades dos oligos, onde em PR572 foi inserido o sítio Bam HI e em PR573 foi inserido o sítio para HindIII. (B) Esquema mostrando o gene *EGFP* e os iniciadores.

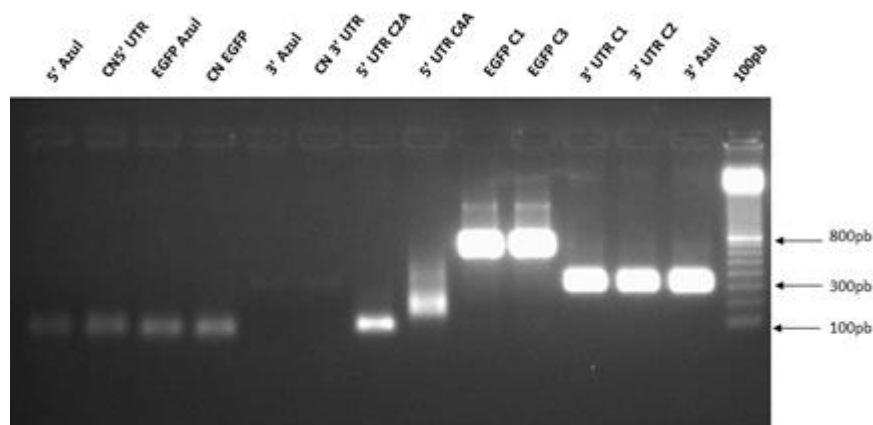
Após a síntese dos oligos e as reações de PCR conforme especificado no Material e Métodos (Tabela 1 e item 2.3) seguida de análise em gel de agarose foi confirmada a amplificação dos fragmentos conforme o esperado (Figura 11): fragmento 5'UTR/ $\beta$ 1i – 91bp; fragmento 3'UTR/ $\beta$ 1i – 342 bp e fragmento gênico da EGFP – 743 bp.



**Figura 11.** Análise dos produtos da amplificação das regiões 5'UTR e 3'UTR do mRNA da subunidade  $\beta$ 1i e do gene *EGFP*. 5'UTR/ $\beta$ 1i: fragmento 5' UTR/ $\beta$ 1i; CN 5'UTR/ $\beta$ 1i: controle negativo da PCR para amplificação do 5' UTR/ $\beta$ 1i; EGFP: amplificação da sequência *EGFP*; CN EGFP: controle negativo da PCR para amplificação do *EGFP*; 3' UTR: amplificação da sequência 3' UTR/ $\beta$ 1i; CN 3' UTR: controle negativo da PCR para amplificação do 3' UTR/ $\beta$ 1i. Marcador de massa molecular: 100 pb *ladder* (Invitrogen). Gel de agarose a 2,5%.

A próxima etapa foi a clonagem dos fragmentos amplificados no vetor de clonagem para produtos de PCR, o plasmídeo pGEM®-T Easy(Promega). Após ligação, transformação da bactéria *E. coli* (item 2.4, Material e Métodos), minipreparação plasmidial de culturas recombinantes (item 2.5, Material e Métodos), uma PCR foi realizada e os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose para que fosse confirmada a inserção das sequências de interesse ao vetor (Figura 12). Foi possível confirmar a inserção ao se observar o tamanho dos produtos gerados: fragmento 5'UTR/ $\beta$ 1i – 91 bp; fragmento 3'UTR/ $\beta$ 1i – 342 bp e fragmento gênico da EGFP – 743 bp.

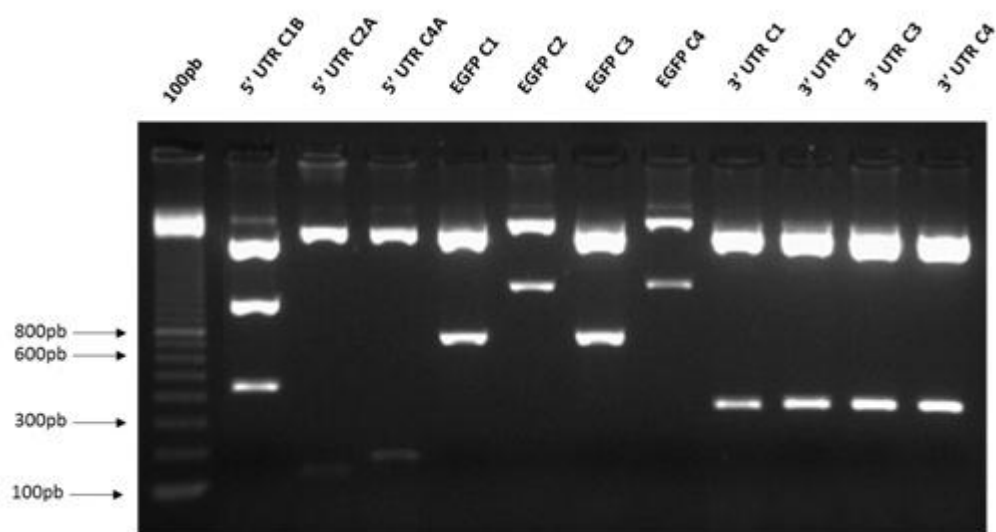




**Figura 12.** Confirmação da clonagem das sequências de interesse no vetor pGEM®-T Easy (Promega) após minipreparação plasmidial e PCR. 5' Azul: contém DNA de bactérias não transformadas (5' UTR/ $\beta$ li); CN 5'UTR/ $\beta$ li: controle negativo do PCR para a sequência 5' UTR/ $\beta$ li; EGFP Azul: DNA de bactérias não transformadas (EGFP); CN EGFP: controle negativo do PCR para a sequência *EGFP*; 3' Azul: plasmídeo contendo DNA de bactérias não transformadas (3' UTR/ $\beta$ li); CN 3' UTR: controle negativo do PCR para a sequência 3'UTR/ $\beta$ li; 5' UTR C2A e 5' UTR C4A: plasmídeo contendo a sequência 5' UTR/ $\beta$ li; EGFP C1 e EGFP C3: plasmídeo contendo a sequência do *EGFP*; 3' UTR C1, 3' UTR C2 e 3' Azul: plasmídeo contendo a sequência 3' UTR/ $\beta$ li. Marcador de massa molecular - 100 pb *Ladder* (Invitrogen). Gel de agarose a 1,5%.

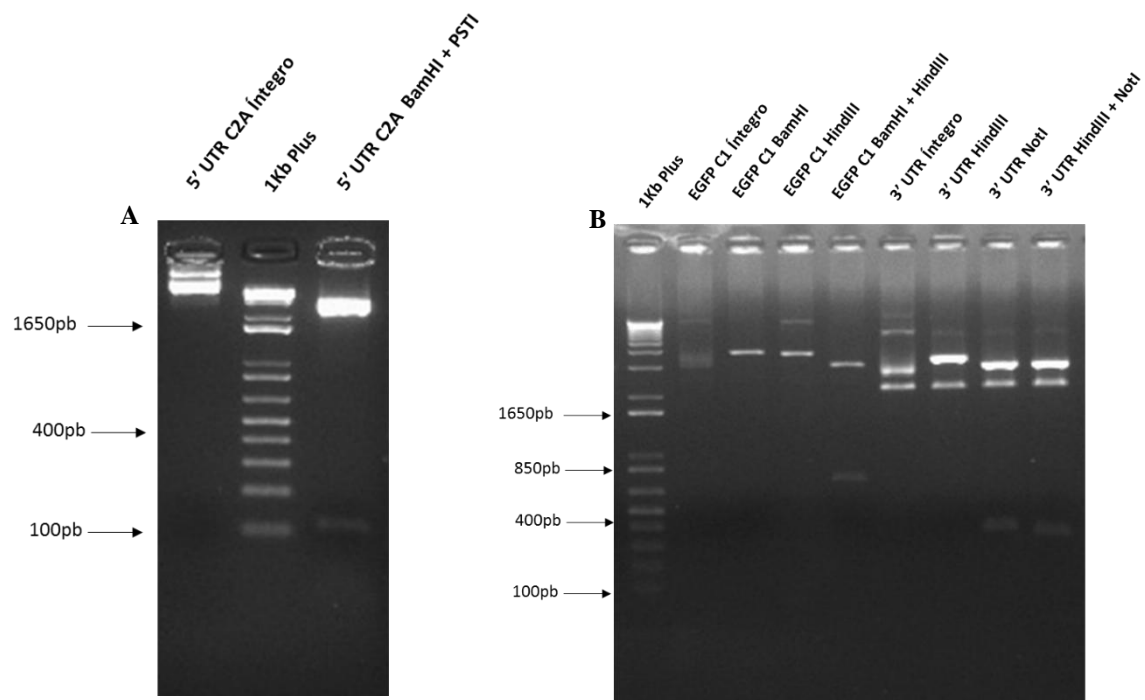
Para confirmar a clonagem dos fragmentos e as suas respectivas massas moleculares, os plasmídeos foram digeridos com *EcoRI* e o perfil de restrição analisado em gel de agarose. Conforme mostrado na Figura 13, o tamanho das inserções foi confirmado conforme esperado: 5'UTR/ $\beta$ li – 102bp; fragmento 3'UTR/ $\beta$ li – 353bp e fragmento gênico da *EGFP* – 754 bp.

As amostras em que os produtos da digestão não apresentaram o tamanho esperado (5' UTR C1B, EGFP C2 e EGFP C4) foram descartadas. As amostras 5' UTR C2A, EGFP C1 e 3'UTR C1 foram as amostras selecionadas para as próximas etapas do experimento dentre as amostras que apresentaram o tamanho esperado.



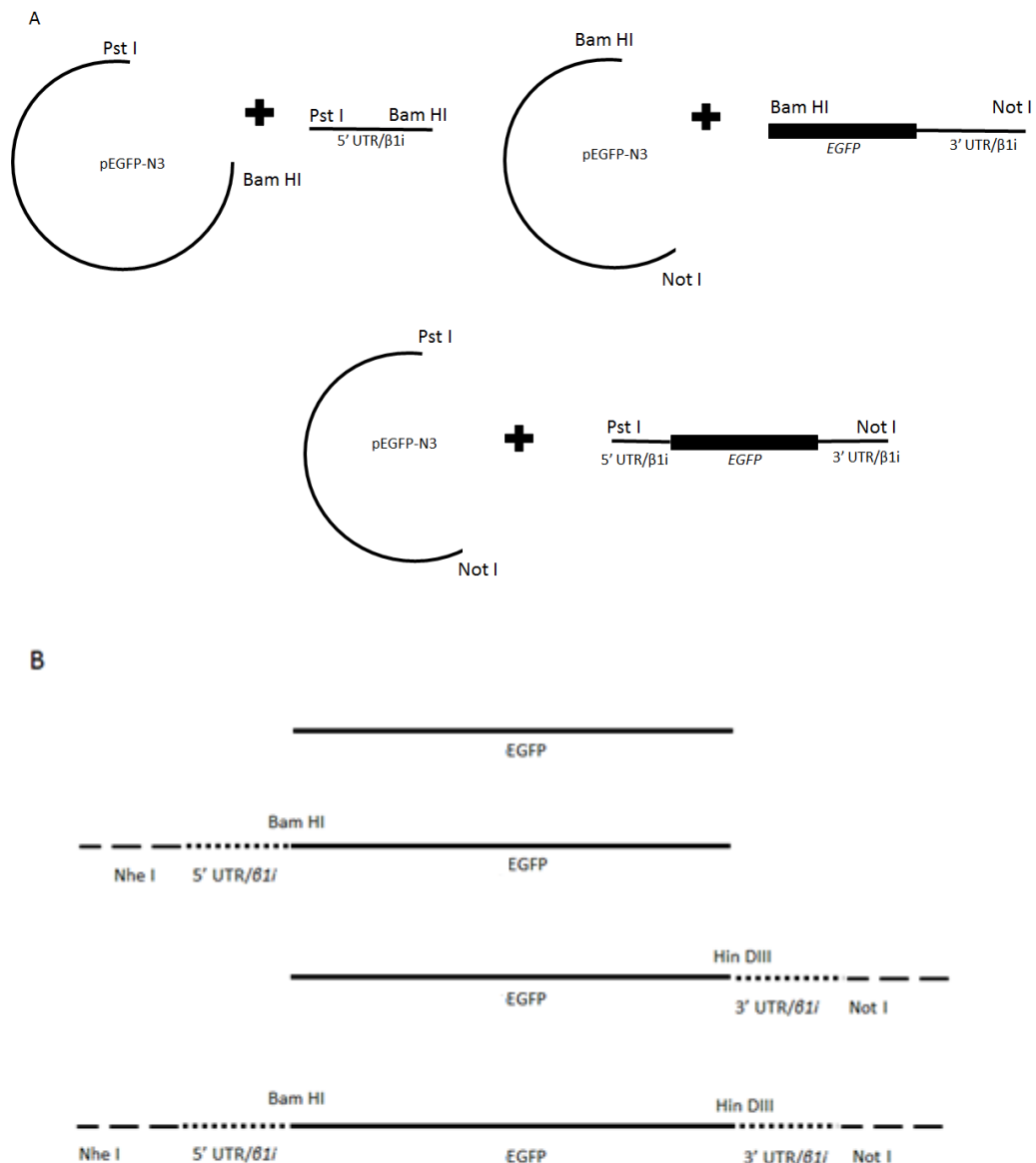
**Figura 13.** Análise da digestão dos plasmídeos recombinantes pGEM®-T Easy (Promega) com a enzima EcoRI (Promega) em gel de agarose. 5' UTR C1B, C2A e C4A: vetores com a sequência 5' UTR/ $\beta$ li; EGFP C1, C2, C3 e C4: sequênciaEGFP; 3' UTR C1, C2, C3 e C4: vetores com a sequência 3' UTR/ $\beta$ li. Marcador de massa molecular 100 pb *Ladder* (Invitrogen). Gel de agarose a 1,5%.

Uma vez confirmada a clonagem dos fragmentos amplificados, o passo seguinte foi a digestão dos plasmídeos recombinantes com as enzimas cujos sítios foram inseridos nos iniciadores (Tabela 1, Material) para fosse confirmado a correta inserção dos sítios de restrição nos fragmentos amplificados e clonados. Foi possível confirmar que os sítios de restrição estavam funcionando como o esperado (Figura 14), porém, devido a problemas com a enzima Nhe I (Biolabs) optamos por utilizar a enzima Pst I (Biolabs) pois a mesma corta um sítio de restrição no vetor muito próximo ao local de ligação do fragmento ao mesmo.



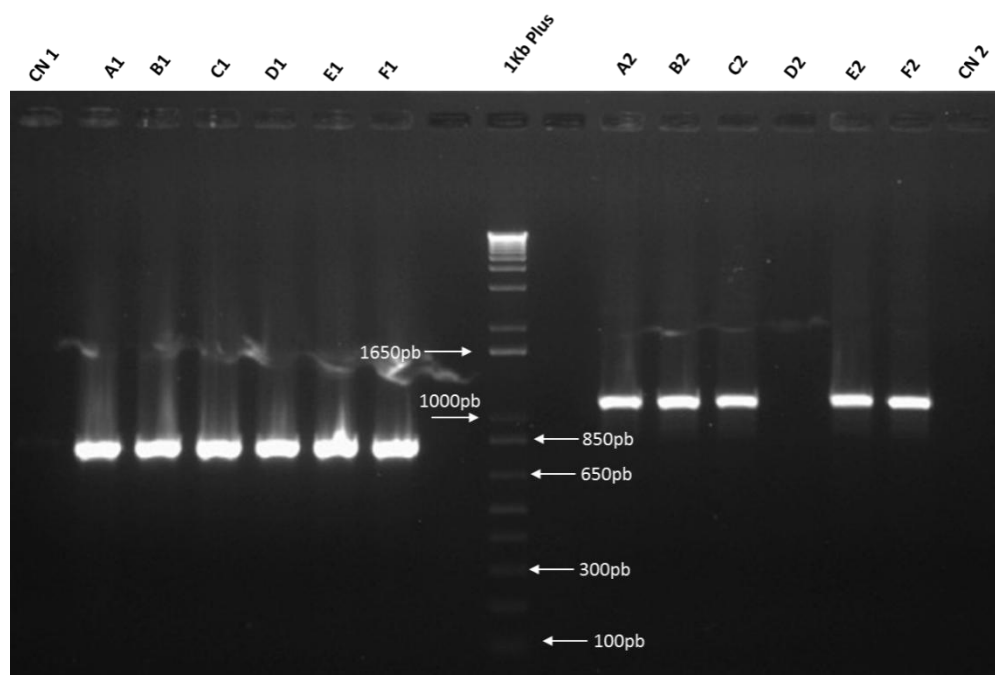
**Figura 14.** Análise das digestões para a confirmação dos sítios de restrição inseridos na amplificação do DNA. Vetor pGEM®-T Easy (Promega) (A) 5'UTR C2A Íntegro: Vetor intacto contendo o fragmento 5'UTR/ $\beta$ 1i; 5'UTR C2A Bam HI + Pst I: vetor digerido com as enzimas BamHI e PstI contendo o fragmento 5'UTR/ $\beta$ 1i. (B) (1%) EGFP C1 Íntegro: vetor intacto contendo o gene EGFP; EGFP C1 Bam HI: digestão simples do vetor com BamHI; EGFP C1 Hin DIII: digestão simples com HindIII, EGFP C1 Bam HI + Hin DIII digestão dupla (BamHI + HindIII); 3' UTR Íntegro: vetor intacto contendo o fragmento 3' UTR/ $\beta$ 1i; 3' UTR Hin DIII digestão simples com Hin DIII; 3' UTR Not I: digestão simples com Not I; 3' UTR Hin DIII + Not I: digestão dupla (HindIII + NotI). Em ambas as imagens o marcador de massa molecular: 1 kb plus ladder (Invitrogen). Gel de agarose a 2,5%.

Depois confirmar a presença das sequências e sítios de restrição foi realizada a subclonagem dos fragmentos no vetor pEGFP-N3 (Figura 7) de modo a obter as diferentes construções mostrada na Figura 8 que foram utilizadas posteriormente nos testes de transfecção. A Figura 15 ilustra a estratégia de montagem conforme os sítios de restrição nas inserções e no vetor.

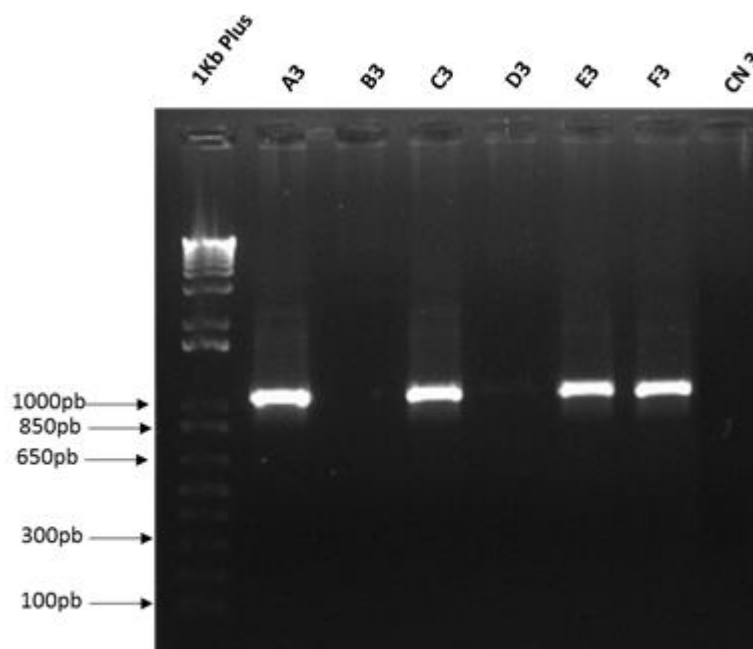


**Figura 15.** Ilustração das montagens feitas com os fragmentos no vetor pEGFP-N3. (A) mostra as digestões e ligações feitas nos fragmentos e no vetor; (B) representa as montagens prontas do gene *EGFP* flanqueado pelas UTRs.

Após a realização das diferentes subclonagens, as construções foram checadas por meio de PCR (Material e Métodos item 2.3) onde os iniciadores foram pareados de forma para amplificar os produtos da montagem ilustrada nas Figuras 8 e 15 e análise em gel de agarose, conforme mostrado nas Figuras 16 e 17. O tamanho dos produtos da PCR foram o esperado para as montagens: 5'UTR/β1i/*EGFP* – 834 bp; 5'UTR/β1i/*EGFP*/3'UTR/β1i – 1.176 bp e *EGFP*/3'UTR/β1i – 1.085 bp.

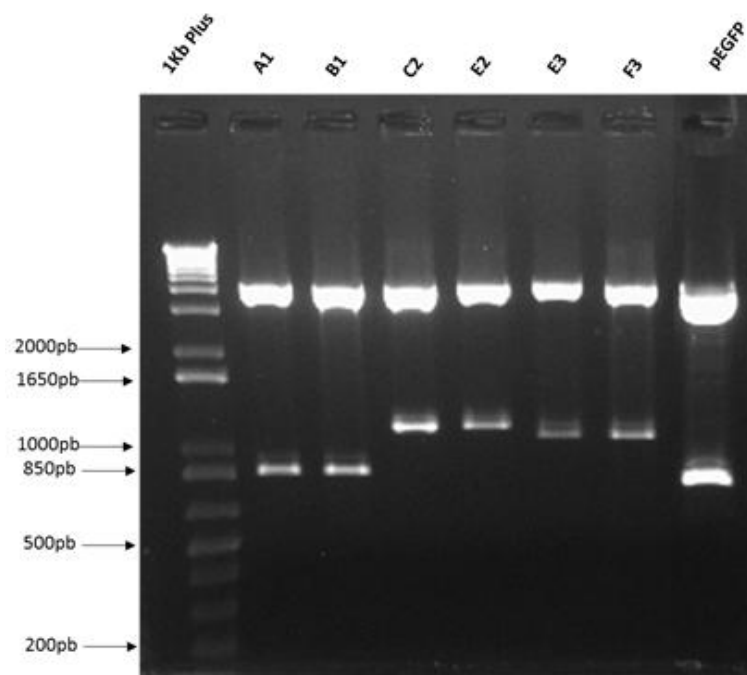


**Figura 16.** Análise da PCR para confirmar a inserção das montagens inseridas no vetor pEGFP-N3. CN1: Controle negativo do PCR para amplificação da montagem 5' UTR/ $\beta$ 1i/*EGFP*; A1, B1, C1, D1, E1, F1: montagem 5' UTR/ $\beta$ 1i/*EGFP*; A2, B2, C2, D2, E2, F2: 5' UTR/ $\beta$ 1i/*EGFP*/3' UTR/ $\beta$ 1i; CN 2: controle negativo do PCR para amplificação da montagem 5' UTR/ $\beta$ 1i/*EGFP*/3' UTR/ $\beta$ 1i. Marcador: 1 kb plus ladder (Invitrogen). Gel de agarose a 1%.



**Figura 17.** Análise da PCR para confirmar a inserção das montagens inseridas no vetor pEGFP-N3. A3, B3, C3, D3, E3, F3: montagem *EGFP*/ 3' UTR/ $\beta$ 1i ligadas ao vetor pEGFP-N3; CN3: controle negativo do PCR para a amplificação da *EGFP*/3' UTR/ $\beta$ 1i. Marcador 1 kb plus ladder (Invitrogen). Gel de agarose a 1%.

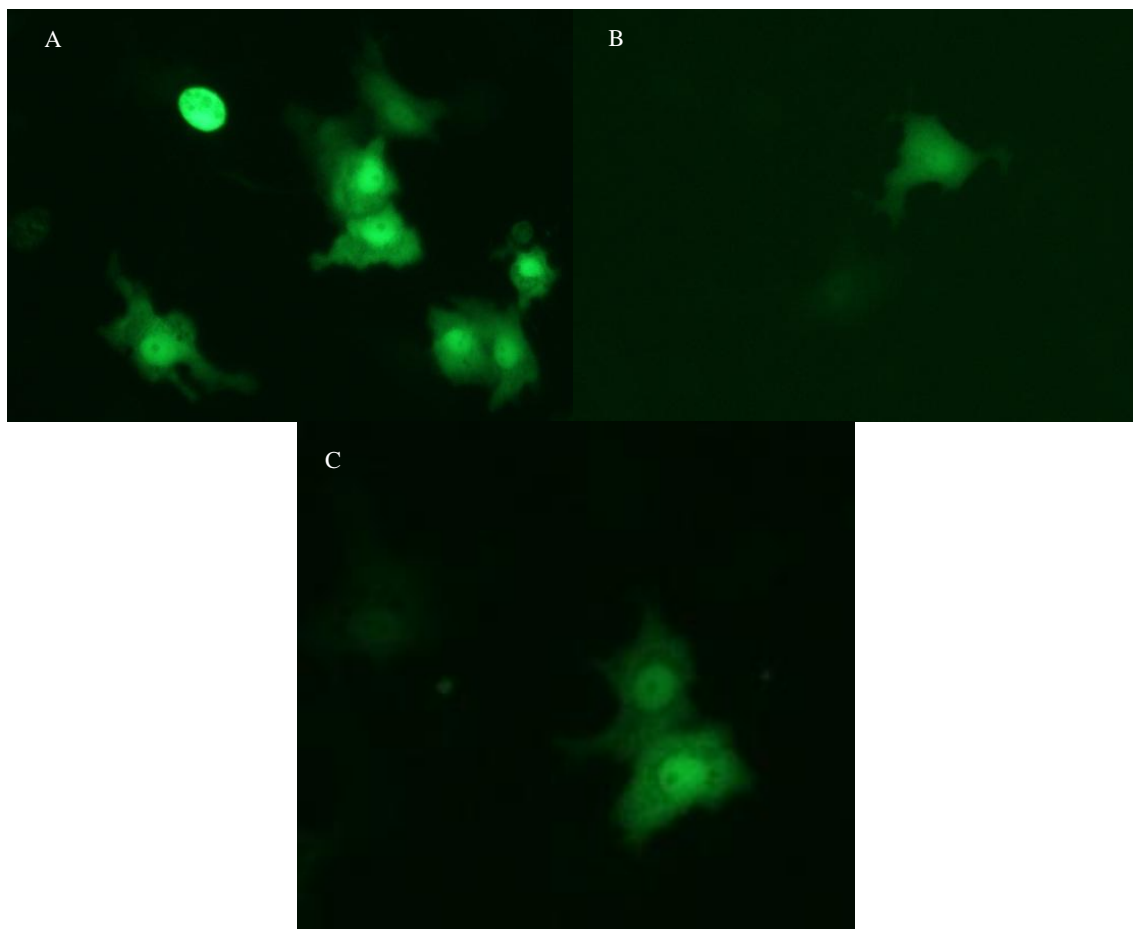
Os plasmídeos contendo as subclonagens foram digeridos para confirmar o resultado indicado pela PCR (Figuras 16 e 17) de que as montagens estavam inseridas no plasmídeo para serem utilizadas posteriormente na transfecção (Figura 18). A inserção das montagens foi confirmada ao se observar fragmentos da digestão de tamanho similar ao obtido aos observados na PCR.



**Figura 18.** Análise da digestão dos vetores pEGFP-N3 contendo as montagens do gene EGFP. A1 e B1: montagem 5'UTR/ $\beta$ 1i/EGFP; C2 e E2:5'UTR/ $\beta$ 1i/EGFP/3' UTR/ $\beta$ 1i; E3 e F3EGFP/3'UTR/ $\beta$ 1i; pEGFP: vetor contendo o gene EGFP. Marcador 1 kb plus *Ladder* (Invitrogen). Gel de agarose a 1%.

Após a confirmação das inserções das montagens do *EGFP* no vetor, uma maxipreparação dos plasmídeos foi realizada como citado no item 2.11 dos métodos para a obtenção de uma quantidade maior de plasmídeos purificados.

Após termos observado que os vetores foram montados conforme o ilustrado na Figura 15, o passo seguinte foi testar a funcionalidade dos mesmos, ou seja, realizamos a transfecção destes vetores em células Hela, de acordo com o descrito item 2.12 (Material e Métodos). Após 48 horas a avaliação da funcionalidade das montagens foi realizada por meio da visualização da emissão de coloração verde pelas HeLas como ilustrado na Figura 19 por meio de microscopia de fluorescência.

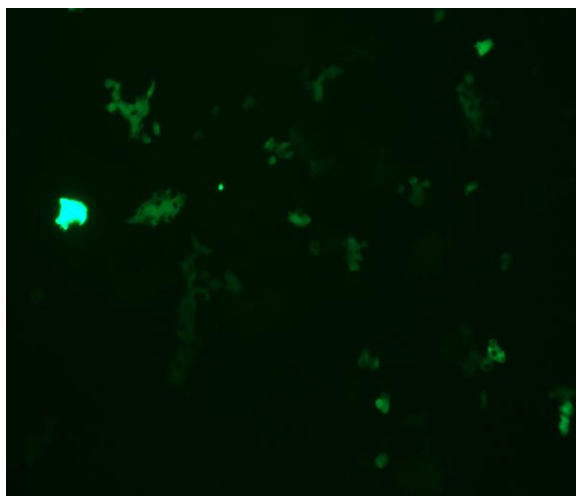


**Figura 19.** Expressão de EGFP em HeLa após 48 horas da transfecção transiente das montagens do gene *EGFP*. (A) transfecção da montagem contendo as sequências UTR 5'/*EGFP*.; (B) transfecção da montagem contendo as sequências UTR 3'/*EGFP*; (C) transfecção da montagem contendo as sequências UTR 5'/*EGFP* /UTR 3'. Aumento 40x.

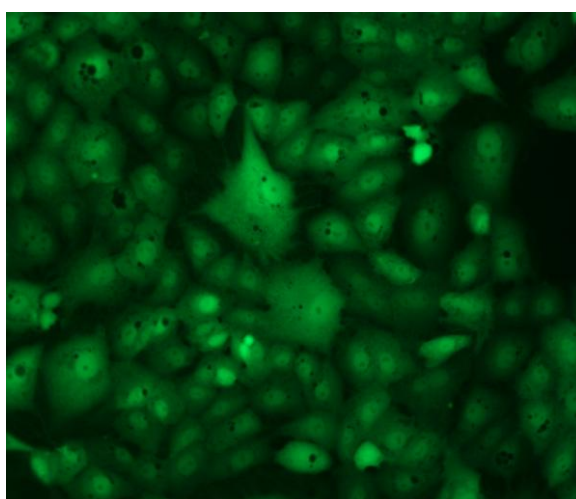
### **Transfecção estável em células HeLa**

Observamos que o uso de transfecção transiente nas células foi um método que apresentava falhas para uma obtenção mais concreta dos dados pretendidos. Os principais problemas observados foram a incerteza de que maior parte da população foi transfectada e se uma eventual infecção das células foi a responsável por cessar ou reduzir a emissão de EGFP ou se aquele indivíduo simplesmente não foi transfectado; o tempo de duração da expressão do gene transfectado (72 h de acordo com o fabricante) em relação ao ciclo intracelular do parasita (72 a 96 h).

A partir destas conclusões, foi decidido gerar células HeLa de transfecção estável e a partir da infecção das células transfectadas com o parasita *T. cruzi*, avaliar se houve queda ou não na intensidade de fluorescência emitida pelas mesmas (Figuras 20 e 21).



**Figura 20.** . Expressão de EGFP em HeLa de transfecção estável a montagem 5' e 3' UTR. Aumento de 20x.



**Figura 21.** Expressão de EGFP em HeLa de transfecção estável do gene *EGFP*. Aumento de 20x.

Após terem sido estabelecidas linhagens de células HeLa de transfecção estável das montagens 5'- *EGFP* – 3' e do vetor pEGFP-N3 sem alterações (Material e Métodos item 2.14) os testes de transfecção e infecção foram realizados em triplicata e a expressão do gene *EGFP* foi avaliada por meio de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência (Material e Métodos itens 2.16 e 2.17, respectivamente).

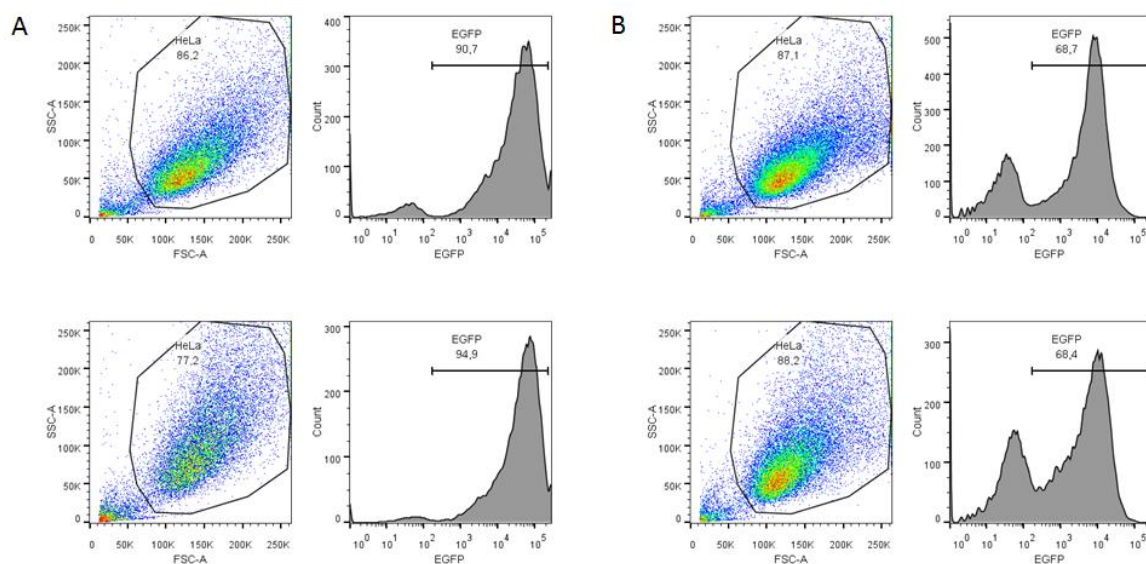
Por meio da citometria de fluxo, observamos que as células que foram transfectadas com vetor pEGFP-N3 sem alterações apresentaram uma forte expressão da proteína fluorescente (Figura 22 A superior). As células transfectadas com vetor pEGFP-N3 e expostas ao parasita estão representadas no gráfico inferior da Figura 22A. Quando comparamos os



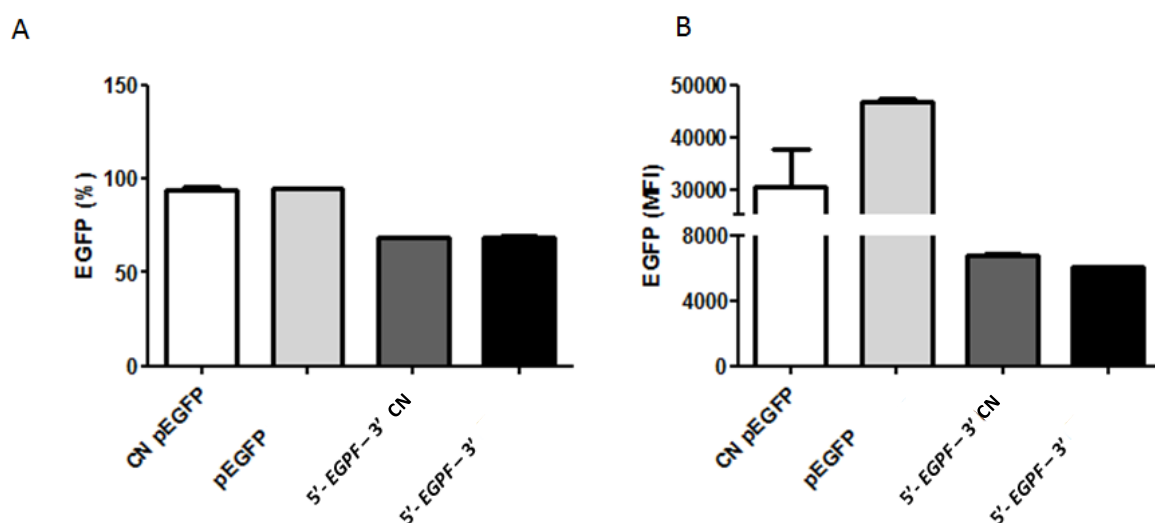
dois grupos, foi possível observar que a presença do parasita no interior das células não inibiu a expressão do gene *EGFP*, uma vez que foi possível visualizar que em ambos os grupos a intensidade de fluorescência estava elevada.

As células transfectadas com a montagem 5'- *EGFP* - 3' estão representadas pela Figura 22B, onde as células transfectadas não expostas ao *T. cruzi* estão expostas na parte superior e as expostas estão representadas no gráfico inferior. A população exposta existe um pequeno grupo que apresentou uma expressão reduzida que não foi observada na população não infectada nem nas populações ilustradas na Figura 22A.

Os gráficos da Figura 23 mostram a porcentagem de células emitindo fluorescência em cada um dos grupos descritos acima. A porcentagem de células emitindo fluorescência foi muito semelhante quando comparadas as células que foram transfectadas com vetor pEGFP-N3, expostas e não expostas ao parasita e células transfectadas com a montagem 5'- *EGFP* - 3' expostas ou não ao parasita. Em relação à média de emissão de fluorescência de cada um dos grupos, as células transfectadas com vetor pEGFP-N3 e expostas ao parasita foi o grupo que apresentou uma maior emissão de fluorescência. Ao compararmos as duas populações de células transfectadas com a montagem 5'- *EGFP* - 3' o gráfico aponta uma pequena queda na média de emissão de fluorescência quando comparada com as células de mesma montagem, mas não expostas ao parasita.



**Figura 22.** Análise da expressão da EGFP por citometria de fluxo. (A) Células transfectadas com o vetor contendo a sequência *EGFP* não flanqueada por sequências UTR em estudo. O gráfico na parte superior representa as células não expostas aos parasitas, enquanto os gráficos da parte inferior representam as células expostas ao *T. cruzi*. (B) Grupo onde as células foram transfectadas com a montagem 5'- *EGFP* - 3', O gráfico na parte superior representa as células não expostas aos parasitas, enquanto os gráficos da parte inferior representam as células expostas ao *T. cruzi*.

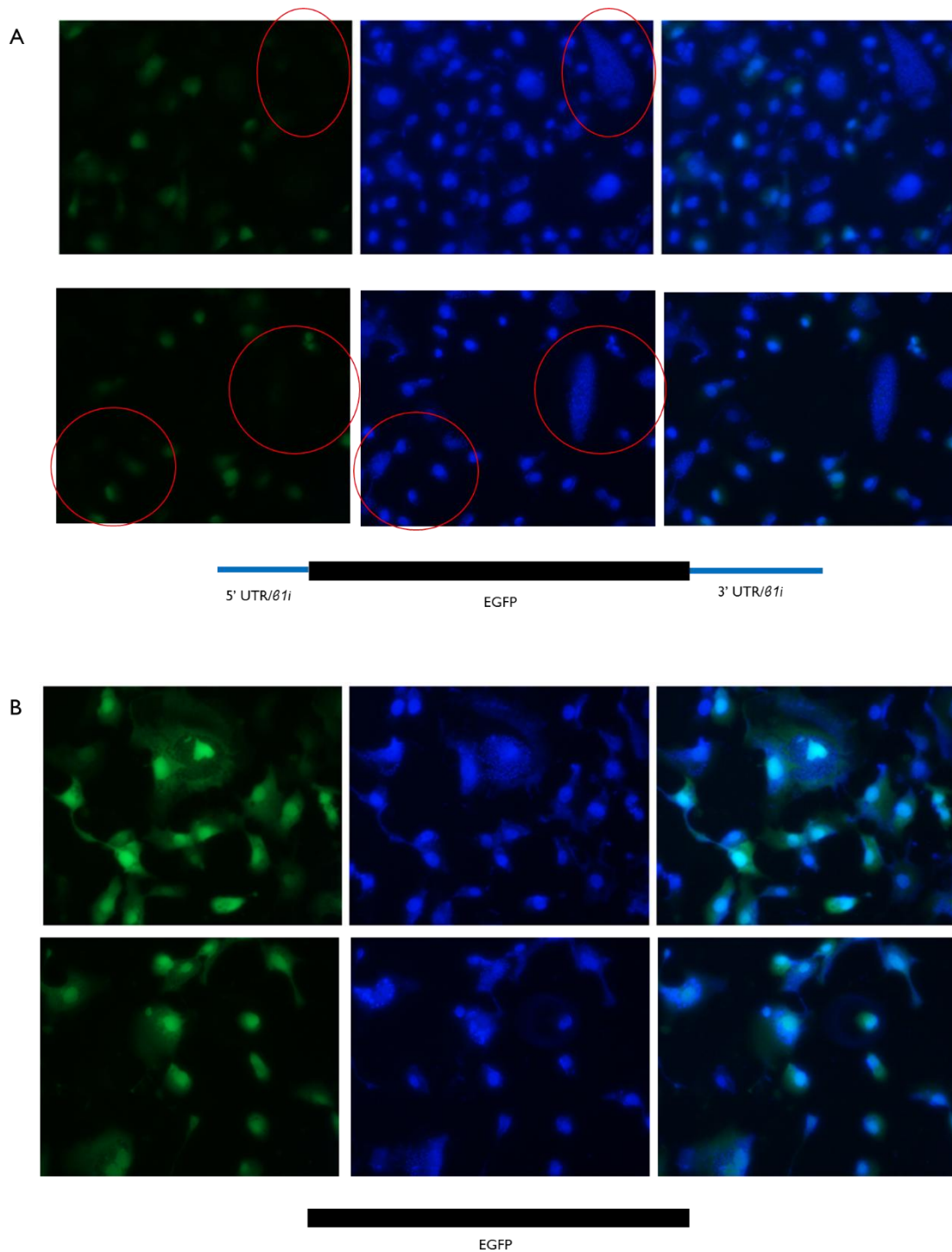


**Figura 23.** Avaliação quantitativa da expressão da EGFP por citometria de fluxo. (A) O gráfico mostra a porcentagem de emissão de fluorescência de cada uma das populações de estudo; (B) Gráfico que mostra a intensidade de fluorescência emitida por cada população testada.

Na microscopia de fluorescência notamos que células contendo a montagem 5'-*EGFP* – 3' que apresentaram uma alta parasitemia (observada com o DAPI) apresentavam expressão muito baixa ou não estavam emitindo fluorescência verde, exceto uma célula vista em toda a amostra que apresentava fluorescência na presença do parasita, quando expostas ao laser para sua visualização (Figura 24A), assim, 96,6% das células observadas nesse grupo que apresentaram parasitemia elevada não expressaram a EGFP.

As células transfectadas com o vetor pEGFP-N3 inalterado e que apresentaram parasitemia elevada não apresentaram inibição da emissão da fluorescência (Figura 24 B) como observado nas células do grupo contendo a montagem 5'-*EGFP* – 3'. No grupo transfectado com o vetor pEGFP-N3 inalterado, 95% da população observada no microscópio emitiam fluorescência verde e dentre os 5% que não emitiam, em apenas 20% desse grupo foi observada a presença de parasitas no interior da célula.

Os dados obtidos apontam a existência de um fator interferente na expressão do gene *EGFP* durante a infecção com *T. cruzi* e que as regiões 5'-*EGFP* – 3' estão vinculadas à inibição da expressão do gene no nível pós-transcricional.



**Figura 24.** Expressão da EGFP em HeLa de transfecção estável do gene *EGFP* e infecção. (A) Células que apresentam a montagem 5'-*EGFP*-3' expostas ao parasita, da esquerda para direita: células expressando fluorescência da EGPF; marcação das células com DAPI; sobreposição das duas imagens; (B) Células contendo apenas o gene *EGFP* expostas ao parasita, da esquerda para a direita: células expressando fluorescência da EGPF; marcação das células com DAPI; sobreposição das duas imagens.

## DISCUSSÃO

A doença de Chagas, provocada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, está entre as principais doenças tropicais negligenciadas no mundo. Estudos realizados anteriormente demonstraram que durante a infecção por *T. cruzi*, algumas subunidades catalíticas de imunoproteassoma não eram expressas, porém o mRNA que seria traduzido nestas subunidades estavam presentes na célula. Com base nessas informações, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as regiões UTR destas subunidades seriam os alvos do parasita durante a infecção para impedir a tradução destas moléculas, interferindo com a formação do imunoproteassoma.

Nossos resultados obtidos por citometria de fluxo demonstram que, de alguma forma, o parasita presente no interior das células HeLa foi capaz de interferir na expressão do gene repórter. Foi possível observar que o número de células que apresentavam uma expressão elevada de fluorescência reduziu e surgiu um novo grupo de indivíduos de baixa expressão que não é encontrado no grupo não infectado (Figura 22).

Os dados obtidos por microscopia de fluorescência corroboram os dados da citometria de fluxo. Pudemos observar que células contendo a montagem 5'-EGFP-3' que apresentavam amastigotas em seu interior não estavam mais emitindo fluorescência (Figura 24A), enquanto as células provenientes do grupo controle continuaram a emitir fluorescência, independentemente de apresentarem parasitas em seu interior ou não.

Os dados obtidos até agora mostram que a presença do parasita no interior da célula interfere na expressão de alguns genes e as regiões UTR são potenciais alvos de atuação do parasita e que a presença do parasita no interior das células não reprime a expressão da proteína generalizada, mas que interfere de forma específica, muito possivelmente nas sequências UTR de estudo. Os dados obtidos são corroborados por estudos realizados por Garcia-Silva et al. (2014), onde eles demonstraram por meio de *microarrays* que células HeLa expostas ao conteúdo de microvesículas produzidas por *T. cruzi* por 2 horas apresentam uma mudança expressiva em seu padrão de expressão gênica (aumento ou redução de expressão) por um período de até 72 horas. O trabalho de Camargo et al. (2014) também demonstrou que a presença do parasita inibe a expressão de subunidades que compõem o imunoproteassoma.

Estudos demonstram que o *T. cruzi* é capaz de evadir o sistema imune do hospedeiro, Maçaneiro (2009) e Camargo et al. (2014) demonstraram que o parasita interfere em componentes do proteassoma/imunoproteassoma e outros componentes da via de apresentação

de antígeno MHC I e apontam uma interferência pós-transcricional na expressão destas subunidades. Deste modo, levantam a hipótese da existência de um mecanismo de inibição específica e que esse mecanismo poderia envolver a ligação de enzimas regulatórias dos parasita às sequências específicas das regiões 5' ou 3' UTR. Os resultados obtidos no presente trabalho veem contribuir para confirmar esse fenômeno para a subunidade  $\beta$ 1i do imunoproteassoma.

Estudos mostram que microrganismos como fungos, bactérias e protozoários produzem moléculas bioativas que modulam a interação parasita-hospedeiro, possibilitando que o patógeno sobreviva e se multiplique no interior do hospedeiro (BAYER-SANTOS et al, 2013). Protozoários parasitas liberam vesículas no meio extracelular e essas vesículas podem carregar biomoléculas, proteínas, mRNAs, miRNA que são capazes de modificar o fenótipo e o funcionamento da célula hospedeira (EVANS-OSSES et al., 2015).

Shin et al. (2015) realizaram testes onde eles infectaram células monocíticas THP 1 com *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* e por meio de PCR em tempo real quantitativo demonstraram que a infecção alterou a expressão de 21 genes que poderiam estar ligados à resposta do sistema imune. Além disso, foi observado que alguns genes foram hiperexpressos e outros tiveram sua expressão reduzida.

Os vírus são outros agentes infecciosos que também desenvolveram formas de evadir o sistema imune das células hospedeiras, como demonstrado por Hu et al. (1999), que demonstrou que o vírus da hepatite B produz uma proteína denominada X que interage com a subunidade  $\alpha$ 7 do proteassoma, inibindo suas atividades proteolíticas. Existem outros estudos que demonstraram a redução nos níveis de proteína TAP1, TAP2,  $\beta$ 1i e  $\beta$ 5i em células infectadas com os vírus HPV tipo 18 E7 e o adenovírus tipo 12E1A (ROTEM-YEHUDAR et al., 1996; PROFFIT; BLAIR, 1997; GEORGOPOULOS et al., 2000). Em contrapartida, existem vírus como o *human papillomavirus* (HPV) que induzem um aumento na atividade do proteassoma para sua permanência na célula hospedeira (BEREZUTSKAYA; BAGCHI, 1997).

Com base nos achados do presente estudo e estudos anteriores, com o próprio *T. cruzi* e outros parasitas intracelulares, o parasita deve produzir uma biomolécula capaz de inibir a expressão da subunidade  $\beta$ 1i do imunoproteassoma e que as regiões UTR são alvos de ação da mesma.

## PERSPECTIVAS

Os dados obtidos no presente trabalho elucidaram um pouco mais sobre a interação do *Trypanosoma cruzi* com sua célula hospedeira. Para continuarmos a conhecer mais sobre essa interação é necessário que o método utilizado nos testes de transfecção/infecção sejam otimizados para que os dados sejam medidos de forma ainda mais sensível. Uma possibilidade é inserção de um segundo gene repórter como o gene *DsRed2* que seria um controle para a transfecção da população em estudo, reforçando ainda mais a certeza de que as células infectadas não estão emitindo mais fluorescência devido à influência do parasita.

Também é importante avaliar se o fenômeno observado no presente estudo se aplica às demais subunidades do imunoproteassoma e outros componentes da via de apresentação de antígenos MHC I.

Por último, é importante que estudos posteriores identifiquem quais biomoléculas produzidas pelo parasita podem ser responsáveis pela interferência na expressão destas proteínas e o mecanismo de ação envolvido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUHAB, A.; TRINDADE, E.; AULICINO, G., B.; FUJII S.; BOCCHI, E.A.; BACAL, F.. Chagas' cardiomyopathy: the economic burden of an expensive and neglected disease. **Int J Cardiol.** 168(3), 2375-80, 2013.
- ANDREWS, N., W.; ABRAMS, C.,K.; SLATIN, S., L.; GRIFFITHS, G., A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH, **Cell**, 61, 7, 1277–1287, 1990.
- ANDREWS, N., W.; WHITLOW, M., B., Secretion of *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 33, 3, 249–256, 1989.
- ANDREWS, N.W.; HONG, K.S.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V., Stage specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, 64, 474-484, 1987.
- ARORA, A.; SUESS, B. An RNA G-quadruplex in the 3' UTR of the proto-oncogene PIM1 represses translation. **RNA Biol**, 8:802-5, 2011.
- BAIRD, S., D.; TURCOTTE, M.; KORNELUK, R.; G.; HOLCIK, M. Searching for IRES. **RNA**, 12, 1755–1785, 2006.
- BARRIAS, E. S.; CARVALHO, T. M. U.; SOUZA, W., *Trypanosoma cruzi*: entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. **Frontiers in Immunology**. 4, 186, 2013.
- BARTHOLOMEU, D., C.; PAIVA, R., M., C.; MENDES, T., A., O.; DAROCHA, W., D.; TEIXEIRA, S., M., R. Unveiling the Intracellular Survival Gene Kit of Trypanosomatid Parasites. **PLOS Pathogens**, 10, 12, 2012.
- BAYER-SANTOS, E.; et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **J Proteome Res** 1;12(2),883-97, 2013.
- BEAUDOIN, J., D.; PERREAULT, J.; P. 5'-UTR G-quadruplex structures acting as translational repressors. **Nucleic Acids Res**, 38:7022-36, 2010.
- BEREZUTSKAYA, E.; BAGCHI, S. The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Functionally Interacts with the S4 Subunit of the 26 S Proteasome. **J. Biol. Chem.**, 272, 30135-30140, 1997.
- BOCHTLER, M., The Proteasome. Annual Review of Biophysics, Biomol and Structure., 28, 295-317, 1999.
- BONALDO, M.C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S., Cell±substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Journal of Cell Biology**, 106, 1349-1358, 1988.
- BOSE, S., et al. g-Interferon decreases the level of 26S proteasomes and changes the pattern of phosphorylation, **Biochemical Journal**, 353, 291-297, 2001.
- BUGAUT, A.; BALASUBRAMANIAN, S. 5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting. **Nucleic Acids Res**, 40:4727-41, 2012.

- CAMARGO et al. *Trypanosoma cruzi* Infection Down-Modulates the Immunoproteasome Biosynthesis and the MHC ClassI Cell Surface Expression in HeLa Cells. **PLOS ONE**, 9, 4, e95977, abril 2014.
- CARDOSO, M., S.; CUNHA, J., R., L.; BARTHOLOMEU, D., C.; Evasion of the Immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. **Frontiers in Immunology**. 6, 659, 2016.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana – Estudo sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. SP., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Revista Brasil-Médico**, 1909
- CHATTERJEE, S.; PAL, J., K., Role of 50- and 30-untranslated regions of mRNAs in human diseases. **Biol. Cell**, 101, 251–262, 2009.
- CHEMALI, M.; RADTKE, K.; DESJARDINS, M.; ENGLISH, L., Alternative pathways for MHC class I presentation: a new function for autophagy, **Cell. Molecular. Life Science.**, 68, 1533–1541, 2011.
- COURA, J., R.; BORGES-PEREIRA, J., Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 45(3), 286-296, maio-junho, 2012.
- DHIMAN, M.; GARG, N., J. NADPH oxidase inhibition ameliorates *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis during Chagas disease **Journal of Pathology**, 225, 583–596, 2011
- DIAS, J. C. P; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. A., Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil: sugestões para sua prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 44(3), 375-379, maio-junho, 2011.
- DUTRA, W., O.; MENEZES, C., A., S.; et al, Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease, **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, 104(Suppl. I), 208-218, 2009.
- DUTRA, W., O.; GOLLOB, K., J., Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease, **Current Opinion in Infectious Disease**, 21, 287-292, 2008.
- EVANS-OSSES, I.; REICHEMBACH, L.H.; RAMIREZ, M.I. Exosomes or microvesicles? Two kinds of extracellular vesicles with different routes to modify protozoan-host cell interaction. **Parasitol. Res.**, 114: 3567-3575, 2015.
- GACZYNSKA, M.; ROCK, K.L.; GOLDBERG, A.L. g-Interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. **Nature**, 365, 264-267, 1993.
- GACZYNSKA, M.; ROCK, K.L.; SPIES, T.; GOLDBERG, A.L. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)**, 91, 9213-9217, 1994.
- GARCIA-SILVA, M., R.; CABRERA-CABRERA, F.; DAS NEVES, R., F., C.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W.; CAYOTA, A. Gene Expression Changes Induced by *Trypanosoma cruzi* Shed Microvesicles in Mammalian Host Cells: Relevance of tRNA-Derived Halves **BioMed Research International**, Article ID 305239, 2014.
- GEBAUER, F.; PREISS, T.; HENTZE, M., W. From cis-regulatory elements to complex RNPs and back. **Cold Spring Harb Perspect Biol** . a012245, 2012.



GEORGOPOULOS, N.,T.; PROFFITT, J.L.; BLAIR, G., E. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. **Oncogene** 19, 4930–4935, 2000.

GLICKMAN, M.H.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway:destruction for the sake of construction, **Physiological Reviews**, 82, 373-428, 2002.

GROETTRUP, M., KHAN, S.; SCHWARZ, K.; SCHMIDTKE, G. Interferon-g inducible exchanges of20S proteasome active site subunits: Why? **Biochimie**, 83, 367-372, 2001.

GROLL M.; HUBER, R. Substrate access and processing by the 20S proteasome coreparticle. **International Journal of Biochemistry**, 35, 606-616, 2003.

GROLL, M.; POTTS, B. C., Proteasome Structure, Function, and Lessons Learned from Beta-LactoneInhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 11, 2850-2878, 2011

HERSHEY, W., B., J.; SONENBERG, N.; MATHEWS, M; B., Principles of Translational Control: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect Biol**,4:a011528, 2012.

HU, Z.; ZHANG, Z.; DOO, E.; COUX O.; GOLDBERG, A., L.; et al. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. **J Virol** 73, 7231–7240,1999.

HUTCHINSON, S.; SIMS, S.; O’HARA, G.; SILK, J.; GILEADI,U.;CERUNDOLO, C.; KLENERMAN, P., A Dominant Role for the Immunoproteasome in CD8+ TCell Responses to Murine Cytomegalovirus, **PLOS ONE**, 6, 2, e14646, 2011.

HYLAND, K., V.; ENGMAN, D., M., Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease. **Trends in Parasitology**, 22, 101-102, 2006.

INOUE, H.; NOJIMA, H. e OKAYAMA, H. High efficiency of Escherichia coli with plasmids. **Gene**, 96:23-28,1990.

IVANOV, P.; ANDERSON, P. Post-transcriptional regulatory networks in immunity. **Immunological Reviews**, 253, 253-72, 2013.

KIERSZENBAUM, F., Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? **Trends in Parasitology**, 21, 513-516, 2005.

KLEFFMANN, T.; SCHMIDT, J.; SCHAUB, G.A., Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of thisproperty to separate stages and promote metacyclogenesis. **Journal of. Eukaryotic. Microbiology**, 45, 548-555, 1998.

KUMARI, S.; BUGAUT, A.; HUPPERT, J.,L.; BALASUBRAMANIAN, S. An RNA G-quadruplex in the 5’ UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. **Nat Chem Biol.**, 3:218-21, 2007

LEE, W.; KIM, K., B.; The Immunoproteasome: An Emerging Therapeutic Target**Current Topics in Medicinal Chemistry**, 11, 2923-2930, 2011.

LEY, V.; ANDREWS, N.W.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V.,Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. **Journal of. Experimental. Medicine**, 168, 649-659, 1988.

LEY, V.; ROBBINS E. S.; NUSSENZWEIG, V.; ANDREWS, N., W., The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome isinhibited by raising the pH of acidic compartments, **Journal of Experimental Medicine**, 171, 2, 401–413, 1990.

LUCEY, B. P.; REES, W. A. N; HUTCHINS, G. M. Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. **Archive of Pathology Laboratory Medicine**, 133, 1463-1467, setembro 2009.

MAÇANEIRO, L. O. F. **Expressão de imunoproteassomas em células infectadas com *Trypanosoma cruzi***. Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, 2009.

MATOUKOVÁ, E.; MICHALOVÁ, E.; VOJTESEK, B.; HRSTKA, R. The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells, **RNA Biology Landes Bioscience**, 9:5, 563-576, 2012.

MIGNONE, F.; GISSI, C.; LIUNI, S.; PESOLE, G. Untranslated regions of mRNAs, **Genome Biology**, 3, 3, 2002.

MOREL, S.; LEVY, F.; BURLET-SCHILTZ, S.; BRASSEUR, F.; PROBST-KEPPER, M. L.; PEITREQUIN, A., L.; et al. Processing of Some Antigens by the Standard Proteasome but Not by the Immunoproteasome Results in Poor Presentation by Dendritic Cells, **Immunity**, 12, 107-117, 2010.

NUNES, M. C. P.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J.; RIBEIRO, A., L. Chagas Disease An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. **Journal of the American College of Cardiology JACC**, 62, 9, 767-776, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> , acessado em janeiro de 2017.

ORLOWSKI, M.; WILK, S., Catalytic Activities of the 20S Proteasome, a Multicatalytic Proteinase Complex. Resultados da pesquisa, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 383(1): 1-16, 2000.

PADILLA, A., M.; BUSTAMANTE, J., M.; TARLETON, R., L., CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection, **Current Opinion in Immunology**, 21, 385-390, 2011.

PEREIRA, P., C., M.; NAVARRO, E., C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 19, 34, 2013.

POVEDA, C.; et al, Cytokine Profiling in Chagas Disease: Towards Understanding the Association with Infecting *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (A BENEFIT TRIAL Sub-Study), **PLOS ONE**, 9, 3, e91154, 2014.

PROFFITT, J., A.; BLAIR, G., E. The MHC-encoded TAP1/LMP2 bidirectional promoter is down-regulated in highly oncogenic adenovirus type 12 transformed cells. **FEBS Lett**, 400, 141-144, 1997.

RAGHAVAN, A.; OGILVIE, R., L.; REILLY, C.; ABELSON, M., L.; RAGHAVAN, S.; VASDEWANI, J.; et al. Genome-wide analysis of mRNA decay in resting and activated primary human T lymphocytes. **Nucleic Acids Res.** 30, 5529-5538, 2002.

RASSI A JR; RASSI A; MARIN-NETO JA. Chagas disease. **Lancet**, 375:1388-1402, 2010.

RASSI Jr, A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M., American Trypanosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, 26, 275-291, 2012.

ROCK, K., L.; GOLDBERG, A., L., Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. **Annual Review of Immunology**, 17, 739-779, 1999.

ROTEM-YEHUDAR, R.; GROETTRUP, M.; SOZA, A.; KLOETZEL, P.M.; EHRLICH, R. LMP- associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for Class I MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic Adenovirus 12. **J Exp Med** 183, 499–514, 1996.

ROUX, P., P.; TOPISIROVIC, I. Regulation of mRNA translation by signaling pathways. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 4:a012252, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH;E.F.; MANIATIS; T. Molecular cloning. **Cold Spring Harbor Laboratory Press.**1. 1.38-1.39, 1989.

SANDBERG R.; NEILSON J. R.; SARMA A.; SHARP P. A.; BURGE C. B. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. **Science** 320:1643-7, 2008;

SHIN, M., K.; SHIN, S., W.; JUNG, M.; PARK, H., PARK, H. E.; YOO, H., S. Host gene expression for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in human THP-1 macrophages. **FEMS Pathogens and Disease**, 73, 5, 2015.

SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. **Folha Clinica Biologia.**, 20: 191-207, 1953.

SONG, J.; PERREAULT, J., P.; TOPISIROVIC, I.; RICHARD, S., T., E. RNA G-quadruplexes and their potential regulatory roles in translation. **Taylor and Francis**, 4, 2, 2016.

SOUZA, W.; CARVALHO, T., M., U.; BARRIAS, E., S., Reviewon *Trypanosoma cruzi* : Host Cell Interaction, **International Journal of Cell Biology**, Article ID 295394, 2010.

STEVEDING, D., The history of Chagas disease, **Parasites & Vectors**, 7,317, 2014.

TARLETON, R., L., Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*,**Current Opinion in Immunology**, 19, 430–434, 2007.

TYLER, K., M.; ENGMAN, D., M., The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited **International Journal for Parasitology**, 31, 472-481, 2001.

VITELLI-AVELAR, D.,M.; SATHLER-AVELAR, R.; DIAS, J.,C.; PASCOAL, V.,P.; TANAKA; K.; KASAHARA, M., The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-ginducible proteasome activator PA28. **Immunology Review.** 163, 161–176, 2005.

WATANABE COSTA, R.; SILVEIRA, J., F.; BAHIA, D. Interactions between *Trypanosoma cruzi* Secreted Proteins and Host Cell Signaling Pathways. **Frontiers in Microbiology**, 7, A 388, 2016.

WOLFE, A.L.; SINGH, K.; ZHONG, Y.; DREWE, P.; RAJASEKHAR, V.,K.; SANGHVI, V.,R.; MAVRAKIS, K., J.; JIANG, M.; RODERICK, J.,E.; VAN DER MEULEN, J.; et al, RNA G-quadruplexes cause eIF4A dependent oncogene translation in cancer. **Nature**, 513:65-70, 2014.